



TUGAS AKHIR - SB141510

**INDUKSI KALUS RUMPUT LAUT
Kappaphycus alvarezii DENGAN
PENAMBAHAN FITOHORMON YANG
BERBEDA**

**DWI FEBRIAN
01311440000008**

Dosen Pembimbing
Dr. Nurul Jadid, S.Si, M.Sc
Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, M.T

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS ILMU ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA 2018**



TUGAS AKHIR - SB141510

**INDUKSI KALUS RUMPUT LAUT
Kappaphycus alvarezii DENGAN
PENAMBAHAN FITOHORMON YANG
BERBEDA**

**DWI FEBRIAN
01311440000008**

**Dosen Pembimbing
Dr. Nurul Jadid, S.Si, M.Sc
Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, M.T**

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS ILMU ALAM
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA 2018**



FINAL PROJECT - SB141510

**CALLUS INDUCTION OF SEAWEED
Kappaphycus alvarezii WITH THE
ADDITION OF DIFFERENT
PHYTOHORMONE**

**DWI FEBRIAN
01311440000008**

**Supervisor
Dr. Nurul Jadid, S.Si, M.Sc
Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, M.T**

**BIOLOGY DEPARTMENT
FACULTY OF SCIENCE
SEPULUH NOPEMBER INSTITUTE OF TECHNOLOGY
SURABAYA 2018**

LEMBAR PENGESAHAN

INDUKSI KALUS RUMPUT LAUT *Kappaphycus alvarezii* DENGAN PENAMBAHAN FITOHORMON YANG BERBEDA

TUGAS AKHIR

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Sarjana Sains
pada
Program Studi S-1
Departemen Biologi
Fakultas Ilmu Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh :

DWI FEBRIAN
NRP. 01311440000008

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir :

Dr. Nurul Jadid, S.Si, M.Sc. (Pembimbing 1)

Dr. techn. Endry Nugroho P., S.Si, M.T. (Pembimbing 2)



INDUKSI KALUS RUMPUT LAUT *Kappaphycus alvarezii*
DENGAN PENAMBAHAN FITOHORMON YANG
BERBEDA

Nama Mahasiswa : Dwi Febrian
NRP : 01311440000008
Departemen : Biologi
Dosen Pembimbing : Dr. Nurul Jadid, M.Sc
Dr. techn. Endry Nugroho P., M.T

Abstrak

Kappaphycus alvarezii merupakan salah satu jenis rumput laut yang dibudidayakan di perairan pulau Madura dan bernilai ekonomis penting serta komoditas unggulan Provinsi Jawa Timur. Salah satu upaya untuk menjaga kualitas dan kuantitasnya adalah teknik pembibitan yang dipilih yaitu melalui teknik kultur jaringan menggunakan eksplan dari tallus rumput laut. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui konsentrasi optimal zat pengatur tumbuh terhadap induksi kalus *K. alvarezii*. Metode penelitian ini adalah pemilihan eksplan rumput laut *K. alvarezii* dan induksi kalus dengan kombinasi zat pengatur tumbuh auksin 2,4-D (2,4-dichloro phenoxyacetic acid) dan sitokinin BAP (6-benzylaminopurine). Konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP meliputi 0 mg/l (kontrol); 3 mg/l; dan 5 mg/l. Data yang diamati antara lain persentase kalus bereksplan dan struktur kalus. Hasil penelitian ini diperoleh tidak berpengaruh terhadap persentase kalus bereksplan. Kombinasi konsentrasi 2,4-D dan BAP yang terbaik pada perlakuan 2,4-D 3 mg/l + BAP 0 mg/l dengan persentase pembentukan kalus 56,67%. Struktur kalus yang terbentuk dengan karakteristik serabut dan berwarna putih yang merupakan kalus berfilamen (filamentous callus).

Kata kunci: BAP, Induksi Kalus, *K. alvarezii*, PES, ZPT 2,4-D

EFFECT OF DIFFERENT PHYTOHORMONE ADDITION ON SEAWEED *Kappaphycus alvarezii* IN CALLUS INDUCTION

Name : Dwi Febrian
NRP : 01311440000008
Department : Biology
Supervisor : Dr. Nurul Jadid, M.Sc
Dr. techn. Endry Nugroho P., M.T

Abstract

Kappaphycus alvarezii is one type of seaweed cultivated in the waters of the island of Madura and become a resources of economically important and excellent commodities East Java Province. One effort to maintain the quality and quantity is selected nursery technique that is through tissue culture techniques using the explant from tallus of seaweed. The purpose of this research is to know the optimal concentration of growth regulator on the formation of callus induction from tallus of *K. alvarezii* explant. The method of this research is selection of *K. alvarezii* seaweed explant and callus induction with a combination of 2,4-D (2,4-dichloro phenoxyacetic acid) auxin and BAP (6-benzylaminopurine) cytokinin. The concentrations of plant growth regulator 2,4-D and BAP include 0 mg/l (control); 3 mg/l; and 5 mg/l. The observed data are the percentage of callus formation and callus structure. The results of this research were not influenced on the percentage of callus formation. The best combination of 2,4-D and BAP concentration at 2,4-D 3 mg/l + BAP 0 mg/l treatment with callus formation percentage 56,67%. Callus structure is formed by the characteristics of fibers and white which is filamentous callus (filamentous callus).

Keywords: BAP, Callus Induction, *K. alvarezii*, PES, ZPT 2,4-D

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadiran Allah SWT atas berkat rahmat yang diberikan sehingga penulis dapat menyusun tugas akhir ini berjudul **Induksi Kalus Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* dengan Penambahan Fitohormon yang Berbeda**. Penyusunan tugas akhir ini merupakan suatu prasyarat untuk memperoleh gelar sarjana strata (S1) pada Departemen Biologi, Fakultas Ilmu Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Penyusunan tugas akhir ini tidak lepas dari bimbingan berbagai pihak. Penulis menghaturkan ucapan terima kasih kepada para pihak yang membantu terselesaikannya tugas akhir ini, yaitu Bapak Dr. Nurul Jadid, S.Si, M.Sc dan Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, M.T selaku pembimbing yang tidak kenal lelah memberikan ilmu, waktu berbagi dan nasihat serta Isdiantoni, M.P yang membimbing saya di lapangan, Ibu Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si, M.Si selaku penguji I dan Wirdhatul Muslihatin, S.Si, M.Si selaku penguji II. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada orangtua, saudara, dan teman angkatan biologi 2014 seperjuangan penelitian tugas akhir ini, sahabat *biomaterial and enzyme technology research group* serta peneliti laboratorium kultur jaringan rumput laut di Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Instalasi Blitok-Kabupaten Situbondo, Jawa Timur yang telah memberikan dukungan baik moril maupun materiil.

Penulis menyadari bahwa penulisan tugas akhir ini masih banyak memiliki kekurangan sehingga kritik dan saran yang membangun. Proposal ini diharapkan dapat berguna bagi masyarakat, bangsa dan negara.

Surabaya, 24 Juni 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	vii
ABSTRAK	ix
<i>ABSTRACT</i>	xi
KATA PENGANTAR	xiii
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
DAFTAR TABEL	xxi
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Permasalahan	3
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan	4
1.5 Manfaat	4
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Rumput laut <i>K. alvarezii</i>	5
2.1.1 Klasifikasi.....	5
2.1.2 Morfologi.....	6
2.1.3 Habitat dan Penyebaran.....	8
2.1.4 Pertumbuhan Rumput Laut.....	9
2.1.5 Siklus Hidup.....	9
2.2 Kultur Jaringan.....	10
2.2.1 Definisi dan Prinsip.....	10
2.2.2 Teknik Perbanyakan Kultur Jaringan.....	11
2.3 Induksi Kalus.....	12
2.4 Eksplan.....	15
2.5 Media Kultur.....	16
2.6 Antibiotik.....	17
2.7 Zat Pengatur Tumbuh.....	18
 BAB III METODOLOGI	

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	23
3.2 Metode yang Digunakan	23
3.2.1 Sterilisasi Alat dan Botol Kultur	23
3.2.2 Pembuatan Media	24
3.2.3 Pemilihan Bibit <i>K. alvarezii</i>	24
3.2.4 Preparasi Eksplan	25
3.2.5 Induksi Kalus	25
3.2.6 Pengamatan Kalus	26
3.3 Rancangan dan Analisis Data	27
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Pemilihan Rumput Laut <i>K. alvarezii</i> sebagai Sumber Eksplan pada Induksi Kalus	29
4.2 Tahap Pembentukan Kalus Rumput Laut <i>K. alvarezii</i> .	30
4.3 Struktur Kalus	33
4.4 Respon Pembentukan Kalus	36
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran	41
 DAFTAR PUSTAKA	 43
LAMPIRAN	57

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 <i>Kappaphycus alvarezii</i>	6
Gambar 2.2 Morfologi <i>K. alvarezii</i>	8
Gambar 2.3 Siklus Hidup Rumput Laut <i>K. alvarezii</i>	10
Gambar 2.4 Struktur kimia 2,4-D	20
Gambar 2.5 Struktur kimia BAP.....	21
Gambar 4.1 Karakter Morfologi <i>K. alvarezii</i>	29
Gambar 4.2 Pembentukan Kalus pada Eksplan Rumput Laut <i>K. alvarezii</i> Selama 60 Hari Pemeliharaan pada Perlakuan 2,4-D 3 mg/l+BAP 0 mg/l	31
Gambar 4.3 Pengamatan Skoring Warna Kalus pada Eksplan Rumput Laut <i>K. alvarezii</i> dengan Perlakuan 2,4-D 3 mg/l+BAP 3 mg/l	34
Gambar 4.4 Diagram Persentase Terbentuknya Kalus pada Eksplan Rumput Laut <i>K. alvarrezii</i> selama 60 Hari Pemeliharaan	38

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Diagram Alur Penelitian	57
Lampiran 2 Komposisi Medium PES	58
Lampiran 3 Perhitungan Persentase Terbentuknya Kalus Rumput Laut <i>K. alvarezii</i>	59
Lampiran 4 Tabel Perhitungan Pengaruh Kombinasi 2,4-D dan BAP pada Persentase Terbentuknya Kalus Rumput Laut <i>K. alvarrezii</i>	60
Lampiran 5 Persentase Terbentuknya Kalus dengan Kombinasi 2,4-D dan BAP pada Kalus Rumput Laut <i>K. alvarezii</i> dari 3 Ulangan	61
Lampiran 6 Data Analisis Uji ANOVA Two Way dengan Menggunakan Aplikasi IBM SPSS Statistics Data Editor	62
Lampiran 7 Langkah Kerja Penelitian Induksi Kalus Rumput Laut <i>K. alvarezii</i>	66
Lampiran 8 Dokumentasi Respon Induksi Kalus pada Eksplan Rumput Laut <i>K. alvarezii</i>	69

Lampiran 9	Dokumentasi Eksplan pada Media Skrining	72
Lampiran 10	Dokumentasi Eksplan pada Media Kombinasi ZPT 2,4-D dan BAP	73

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 3.1	<div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-bottom: 5px;"> Skoring Pengamatan Warna </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Kalus..... 27 </div>
Tabel 4.1	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Skoring Warna pada Kalus dengan </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Perlakuan Kombinasi ZPT 2,4-D dan </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> BAP 33 </div>
Tabel 4.2	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Hasil Persentase Terbentuknya Kalus </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> (Sintasan) pada Eksplan Rumput </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Laut <i>K. alvarezii</i> pada Berbagai </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> Kombinasi ZPT 36 </div>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Rumput laut merupakan salah satu komoditas ekspor Indonesia yang diandalkan untuk pemasukkan devisa negara dan telah dikenal sebagai bahan dasar dalam industri makanan, kosmetik, farmasi, maupun sebagai bahan pendukung dalam industri lain, seperti industri: kertas, tekstil, pasta gigi, produk ikan atau daging, dan pupuk (Farid, 2008). *K. alvarezii* merupakan salah satu jenis penghasil rumput laut karaginan yang banyak dibudidayakan di Indonesia karena peluang pasar dunia yang belum terpenuhi terhadap produksi rumput laut masih tinggi yakni tahun 2007 sekitar 53.100 ton dan diperkirakan akan meningkat menjadi 72.510 ton pada tahun 2010 (Anggadiredja, 2007). Rumput laut ini adalah salah satu jenis rumput laut yang dibudidayakan di perairan Kepulauan Madura dan menjadi sumberdaya perikanan yang bernilai ekonomis penting serta komoditas unggulan Provinsi Jawa Timur. Permintaan pasar pada rumput laut jenis ini adalah sekitar 8 kali lebih banyak dari jenis lainnya di samping beberapa spesies lainnya seperti *Eucheuma denticulatum* dan *Kappaphycus striatum* (Sulistijo, 2002). Upaya peningkatan produksi rumput laut ini harus didukung karena ketersediaan benih berkualitas secara terus menerus diperlukan (Sulistiani, *et al.*, 2012).

Kabupaten Sumenep merupakan daerah penghasil rumput laut terbesar di Jawa Timur yang lokasi wilayahnya berada pada ujung Pulau Madura (Indriani & Sumiarsih, 2003). Wilayah pantai yang landai, ekosistem terumbu karang dan perairan laut yang relatif tenang memacu perkembangan usaha budidaya, dan dengan luas area budidaya 5.795 ha dapat menghasilkan 3.224,70 ton rumput laut per tahun (Jailani *et al.*, 2015).

Berdasarkan Keputusan Kementerian Kelautan dan Perikanan Nomor 35/KEPMEN-KP/2013 tentang penetapan kawasan minapolitan untuk pengembangan perikanan berbasis perikanan

budidaya di Jawa Timur. Minapolitan merupakan upaya percepatan pengembangan pembangunan kelautan dan perikanan disentra-sentra produksi perikanan yang memiliki potensi untuk dikembangkan. Pengembangan minapolitan bertujuan untuk meningkatkan kualitas produk kelautan dan perikanan, pendapatan nelayan, budidaya dan pengolahan ikan yang adil dan merata, serta mengembangkan kawasan minapolitan sebagai pusat pertumbuhan ekonomi di daerah dan sentra-sentra produksi perikanan sebagai penggerak ekonomi (KKP, 2014).

Penetapan Kabupaten Sumenep sebagai daerah kawasan minapolitan rumput laut yaitu berada di kecamatan Saronggi diharapkan dapat mendukung tercapainya program pembangunan perikanan dan kelautan, dapat mendukung peningkatan produksi secara nasional (KKP, 2014). Kecamatan Saronggi adalah salah satu desa yang menjadi sentra budidaya rumput laut berada di desa Pagarbatu. Sebagian besar masyarakat di desa ini mata pencahariannya memang bergantung pada kekayaan laut, dan salah satunya adalah rumput laut. Rumput laut menjadi unggulan masyarakat desa Pagarbatu karena desa tersebut berada di daerah pantai (Wulandari, 2016)

Permasalahan teknis budidaya merupakan salah satu hal yang paling krusial yang menyebabkan belum berhasilnya produksi massal rumput laut di kabupaten Sumenep (Jailani *et al.*, 2015). Berat awal benih, jarak ikat, pemanfaatan kolom air, penanganan harian, pencegahan hama dan penyakit merupakan aspek-aspek budidaya rumput laut yang belum dikuasai secara optimal oleh praktisi budidaya (Tiwa *et al.*, 2013).

Penggunaan benih yang berulang pada satu lokasi yang sama dapat menyebabkan penurunan kualitas karagenan maupun pertumbuhan yang ditandai dengan pertumbuhan yang kurang maksimal (Yong *et al.*, 2013). Masalah serius lainnya yang menimbulkan kerugian cukup besar dalam budidaya rumput laut di daerah Sumenep adalah penyakit *ice-ice* (bercak putih). Penyakit ini merupakan penyakit yang timbul pada musim laut tenang dan arus lemah dan berlangsung selama 1-2 bulan, apabila

lahan ditanami terus tanpa memperhatikan kondisi lingkungan maka akan terjadi kerugian yang berkelanjutan (Sulistijo, 2002).

Salah satu upaya perbanyakan yang dilakukan dalam mengatasi kekurangan bahan benih yaitu melalui teknik kultur jaringan (kultur kalus) menggunakan eksplan dari tallus rumput laut telah berhasil dilakukan (Amini *et al.*, 1995; Suryati *et al.*, 2007). Penerapan teknik kultur jaringan yang berhasil diaplikasikan, diharapkan dapat membantu menghasilkan rumput laut yang unggul, sehingga meningkatkan pemberian benih yang dibutuhkan untuk budidaya dan menghasilkan bibit yang seragam, tingkat pertumbuhan yang lebih tinggi dalam jumlah banyak namun dalam waktu singkat. (Dawes & Koch, 1991; Reddy *et al.*, 2003).

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sulistiani telah mengungkapkan bahwa penambahan fitohormon (zat pengatur tumbuh) BA 1 mg/l menghasilkan tingkat induksi kalus tertinggi pada media PES sebesar 70%, sedangkan penambahan IAA atau NAA menghasilkan penurunan laju induksi kalus rata-rata sebesar 40 hingga 50%, bahkan kombinasi NAA 1mg/l dan BA 1 mg/l menghasilkan pertumbuhan kalus yang rendah dan signifikan sebesar 29% (Sulistiani *et al.*, 2012). 2,4-D merupakan salah satu golongan auksin yang paling sering digunakan untuk induksi dan pertumbuhan kalus karena efektif untuk tahap inisiasi serta aktif dalam waktu yang lama (Ayuningrum *et al.*, 2015; Wattimena, 2001). Berdasarkan uraian tersebut diperlukan penelitian tentang pengembangan kultur *in vitro* dengan penambahan fitorhormon yang berbeda dengan kombinasi 2,4-D dan BAP untuk induksi kalus rumput laut *K. alvarezii* yang berasal dari Sumenep-Madura dengan mengoptimalkan parameter yang diketahui mempengaruhi pertumbuhan *K. alvarezii* secara *in vitro*.

1.2 Rumusan Permasalahan

Peningkatan kualitas dan kuantitas budidaya *K. alvarezii* dapat ditingkatkan melalui perbanyakan bibit yang unggul. Teknik kultur jaringan dipilih untuk menghasilkan bibit dengan

kualitas yang sama dan tingkat homogenitas yang tinggi. Upaya teknik induksi kalus melalui optimasi fitohormon yang berbeda pada pembentukan kalus menjadi kunci dalam perbanyakan bibit.

1.3 Batasan Masalah

Batasan Masalah dari penelitian ini adalah :

1. Eksplan berasal dari tallus rumput laut *K. alvarezii* yang terdapat di pesisir Pantai Pagar Batu, Kecamatan Saronggi, Kabupaten Sumenep
2. Media yang digunakan dalam kultur rumput laut *K. alvarezii* yaitu media PES (*Provasoli Enriched Seawater*) *semi solid* dengan penambahan zat pengatur tumbuh dari golongan auksin yaitu 2,4-D (*2,4 Dichloro Phenoxy Acetic Acid*) dan golongan sitokinin yaitu BAP (*Benzil Amino Purin*)
3. Parameter kalus meliputi persentase terbentuknya kalus dan pengamatan struktur visual kalus dengan menggunakan mikroskop
4. Penelitian ini dilakukan dalam skala laboratorium.

1.4 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi optimal zat pengatur tumbuh dalam induksi kalus *K. alvarezii*.

1.5 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai tahap awal dalam perbanyakan bibit rumput laut *K. alvarezii* secara *in vitro* melalui induksi kalus.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii*

2.1.1 Klasifikasi

Rumput laut dikelompokkan empat kelas berdasarkan dalam empat kelas yaitu alga hijau (Chlorophyceae), alga hijau biru (Cyanophyceae), alga coklat (Phaeophyceae) dan alga merah atau Rhodophyceae (Anggadiredja, 2006). Rhodophyceae mempunyai kenampakan warna talus yang bervariasi. Warna talus yang bervariasi disebabkan adanya komposisi pigmen yang terdiri dari klorofil a, klorofil d, dan fikobiliprotein (R-fikosianin, allofikosianin serta fikoeritrin) (Lee, 2008). Fikoeritrin merupakan pigmen dominan pada alga merah. Pigmen tersebut memberikan kenampakan warna merah pada alga karena memiliki sifat adaptasi kromatik, yaitu penyesuaian antara proporsi pigmen dengan berbagai kualitas pencahayaan dan dapat menimbulkan berbagai warna pada talus seperti merah tua, coklat, kuning dan hijau (Winarno, 1996). Berdasarkan hasil penelitian diperoleh informasi mengenai persentase kandungan pigmen pada *K. alvarezii*, yaitu klorofil a (74,920%), turunan klorofil a (16,419%), karoten (0,947%), xantofil (0,727%), dan lutein (6,988%) (Dewangga, 2008). Klasifikasi *K. alvarezii* menurut Dawes (1981), Bold & Wynne (1985), Lewis *et al.* (1987), Kadi dan Atmadja (1988) ialah sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Archaeplastida (Plantae)</i>
Filum	: Rhodophyta
Kelas	: Rhodophyceae
Ordo	: Gigartinales
Famili	: Solieriaceae
Genus	: <i>Kappaphycus</i>
Spesies	: <i>Kappaphycus alvarezii</i>



Gambar 2.1 *Kappaphycus alvarezii* (Hitler, 2011).

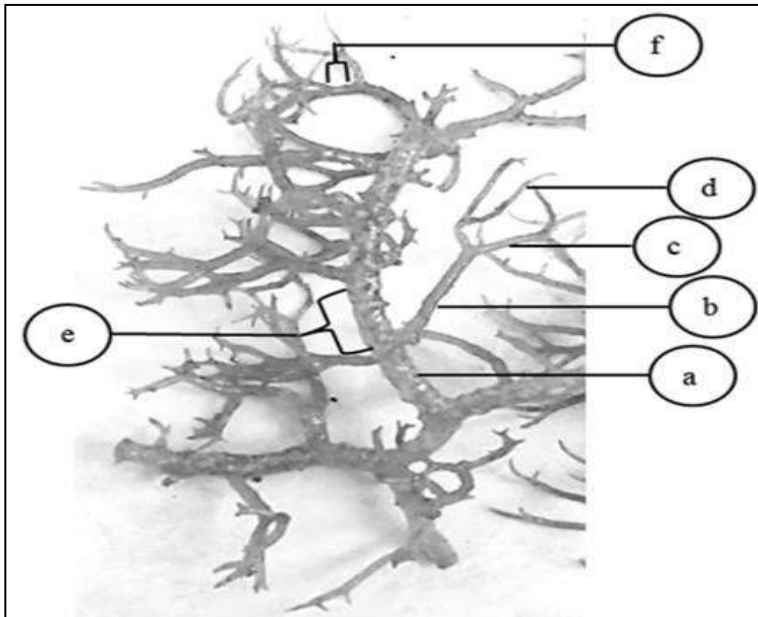
2.1.2 Morfologi

Talus *K. alvarezii* berbentuk bulat, memanjang, bercabang-cabang, terkadang pola percabangannya terdapat dua atau tiga, bentuk setiap ujung percabangannya runcing dan tumpul dan tidak tersusun melingkar. Percabangannya tumbuh ke berbagai arah dengan batang utama keluar saling berdekatan ke daerah basal (pangkal). Permukaan kulit luar cukup kasar karena memiliki gerigi dan bintik-bintik besar, serta talus berwarna dari kuning kecoklatan hingga merah ungu (Afrianto & Liviawati, 1993). Cabang-cabang yang tumbuh membentuk rumpun dengan ciri khusus mengarah ke arah datangnya cahaya matahari. Percabangan yang tumbuh juga memiliki sifat lain, yaitu *alternatus* (berseling), tidak teratur, serta dapat bersifat *dichotomous* atau percabangan dua-dua maupun *trichotomous* atau percabangan tiga-tiga (Atmadja *et al.*, 1996). *K. alvarezii* di daerah Saronggi memiliki talus tampak terlihat lebih panjang dan lebih berisi setelah aklimatisasi dengan bentuk percabangan berselang tidak teratur *dichotomous* atau bercabang dua terus-menerus serta berwarna hijau yang dikarenakan faktor lingkungan dan merupakan proses adaptasi kromatik yaitu penyesuaian warna talus berdasarkan kualitas pencahayaan yang diterima. (Aslan, 2005; Basyirah 2017). Warna hijau pada *K. alvarezii* daerah Saronggi dikarenakan komposisi pigmen klorofil yang dominan

dikandungnya dibandingkan pigmen fikoeritrin (warna merah) (Merdekawati & Susanto, 2009).

Bagian rumput laut *K. alvarezii* pada Gambar 4.1 menunjukkan bahwa secara sederhana terdiri dari talus dan *holdfast*. Bagian yang menyerupai batang pada rumput laut ini dinamakan talus. Talus terdiri dari talus utama, sekunder dan tersier. Talus utama adalah diameter primer, cabang I adalah diameter sekunder, sedangkan adalah cabang II dan III adalah diameter tersier (Unyayar *et al.*, 1996).

Holfast ialah bagian yang menyerupai akar. Melekatnya *holdfast* pada substrat tidak menyerap makanan seperti halnya fungsi akar pada tumbuhan tingkat tinggi tetapi hanya sebagai alat perekat dan penumpu sehingga tumbuhnya dapat kuat dan menetap. Talus sekunder dan tersier merupakan *stipe* (batang), dimana menurut Stekoll *et al.* (2006) batas panjang *stipe* ialah dimulai dari titik tumbuh hingga ke ujung terakhir. Internodus talus sekunder adalah jarak antara tiap titik penempelan talus sekunder pada talus utama, sementara internodus talus tersier adalah jarak antara tiap titik penempelan talus tersier pada talus sekunder. Talus utama adalah tempat menempelnya talus sekunder, talus sekunder adalah tempat menempelnya talus tersier, talus tersier adalah tempat menempelnya *blade* atau disebut juga bakal talus yang menempel pada talus terakhir atau bagian serupa daun. *Blade* menyediakan sebagian besar permukaan fotosintetik bagi alga (Campbell, 2012; Batu, 2014).



Gambar 2.2 Morfologi *Kappaphycus alvarezii*. a) talus utama, b) cabang I, c) cabang II, d) cabang III, e) ruas primer dan f) ruas sekunder (Fadilah *et al.*, 2016).

2.1.3 Habitat dan Penyebaran

Rumput laut umumnya tumbuh dengan baik dan cepat di daerah pantai yang terdapat terumbunya, karena di tempat inilah beberapa persyaratan untuk pertumbuhannya banyak terpenuhi, diantaranya kedalaman perairan, cahaya, substrat, gerakan air dan lainnya (Aslan, 1998). Jenis rumput laut ini umumnya tumbuh baik didaerah yang selalu terendam air dan melekat pada substrat dasar yang berupa karang mati, karang hidup dan cangkang molusca. *K. alvarezii* biasanya di alam berkumpul dalam satu komunitas jenis ini tampaknya sangat penting terutama dalam hal penyebaran spora *K. alvarezii* lebih menyukai variasi suhu harian yang kecil (Destalino, 2013).

K. alvarezii tumbuh di rata-rata terumbu karang dangkal sampai kedalaman 6 meter, melekat di batu karang, cangkang kerang dan benda keras lainnya. Faktor yang sangat berpengaruh pada pertumbuhan jenis ini yaitu cukup arus dan salinitas (kadar garam) yang stabil, yaitu berkisar 28-34 per mil. *K. alvarezii* ini akan hidup baik apabila jauh dari muara sungai dan jenis ini telah dibudidayakan dengan cara diikat pada tali sehingga tidak perlu melekat pada substrat karang atau benda lainnya (Anggadiredja, 2006 dalam Daniel, 2012). Tipe ekosistem dasar perairan lokasi budidaya *K. alvarezii* di daerah Saronggi berupa dasar perairan yang berpasir dan cukup dekat dengan muara sungai (Basyirah, 2017).

2.1.4 Pertumbuhan Rumput Laut

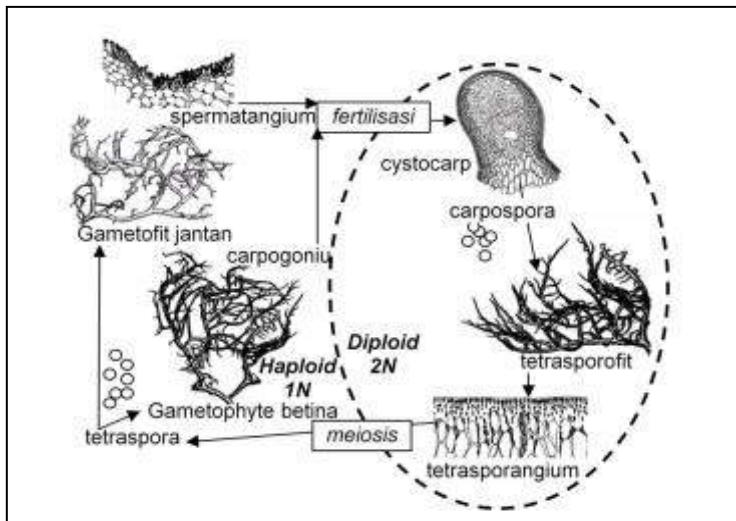
Pertumbuhan rumput laut *K. alvarezii* sangat dipengaruhi oleh dua faktor yaitu faktor eksternal dan faktor internal. Faktor internal yang berpengaruh terhadap pertumbuhan alga laut antara lain jenis, galur, bagian talus dan umur. Sedangkan faktor eksternal yang berpengaruh antara lain keadaan lingkungan fisik dan kimiawi perairan (Tuiyo, 2016).

Faktor pengelolaan oleh manusia dalam kegiatan budidaya alga laut kadang merupakan faktor utama yang harus diperhatikan selain faktor eksternal dan internal seperti substrat perairan dan juga jarak tanam bibit (Soegiarto *et al.*, 1985 dalam Duma, 2012). Pertumbuhan alga laut akan lebih baik pada daerah yang pergerakan airnya cukup, karena pergerakan air ini dapat berfungsi memecah lapisan atas dan mengosongkan air dekat tanaman, sehingga menyebabkan meningkatnya proses difusi (Tuiyo, 2016).

2.1.5 Siklus Hidup

Rumput laut bereproduksi meliputi dua cara yaitu generatif (seksual) dengan gamet (talus diploid yang menghasilkan spora), dan vegetatif (aseksual) dengan talus (Afrianto & Liviawati, 1993; Anggadiredja, 2006). Reproduksi secara generatif terjadi

dengan adanya peleburan antara gamet-gamet yang berbeda yaitu antara spermatozoid yang dihasilkan dalam anteredia dengan sel telur atau ovum yang dihasilkan dalam oogenium (Iksan, 2005). Reproduksi secara vegetatif yaitu fragmentasi terjadi pada alga uniseluler yaitu dengan cara pembelahan sel sedangkan pada alga multiseluler, talus akan patah menjadi bagian-bagian yang lebih kecil kemudian tiap bagian tersebut akan tumbuh menjadi individu baru yang awalnya tetrasporofit yang hidup bebas (diploid) sel-selnya menjalani proses meiosis (Iksan, 2005).



Gambar 2.3 Siklus Hidup Rumput Laut *K. alvarezii* (Dawes, 1981).

2.2 Kultur Jaringan

2.2.1 Definisi dan Prinsip

Kultur jaringan adalah subjek yang berhubungan dengan kultur dan perbanyakan sel, jaringan, organ dan bagian lainnya pada tanaman secara aseptik dalam kondisi *in vitro* (Burla, *et al.*, 2014). Prinsip utamanya adalah perbanyakan tanaman dengan

menggunakan bagian vegetatif tanaman, menggunakan media buatan yang dilakukan di tempat steril (Iswanto, 2002). Sterilisasi merupakan proses yang secara efektif membunuh atau menghilangkan semua mikroorganisme seperti jamur, bakteri, virus, bentuk spora, peralatan, makanan, obat atau media kultur biologis dalam kondisi aseptik (Silindir & Özer, 2009).

Kultur jaringan mempunyai keunggulan seperti: tingginya homogenitas tanaman, tingginya vigor tanaman, memiliki genetik yang sama dengan induknya. Penggunaan bibit hasil kultur jaringan juga akan mengurangi biaya pemeliharaan seperti penyulaman atau seleksi bibit inferior dan umur produksi lebih singkat (Lestari, 2008). Kelemahan teknik kultur jaringan misalnya variasi somaklonal menyebabkan penyimpangan fenotip dari sifat genetik tanaman induk. Hal ini terjadi karena subkultur yang berlebihan serta embriogenesis tidak langsung (perbanyakan kalus) dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan terlalu tinggi (Mariska *et al.*, 1992).

2.2.2 Teknik Perbanyakan Kultur Jaringan

Metode perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan dapat dilakukan melalui tiga cara yaitu:

1. Pembentukan tunas adventif atau organogenesis

Organogenesis merupakan proses pembentukan organ seperti embrio, akar, daun dan tunas dari eksplan. Pembentukan organ tersebut terjadi secara langsung dan tidak langsung. Pada pembentukan organ secara langsung, eksplan berupa bagian jaringan seperti daun, batang, petal atau akar, dan potongan umbi atau biji akan membentuk tunas adventif, sedangkan pada pembentukan tunas secara tidak langsung, eksplan akan tumbuh menjadi kalus meristematik dahulu sebelum membentuk tunas (Bhojwani & Razdan, 1983).

2. Proliferasi tunas pucuk dan tunas aksilar

Perbanyakan melalui tunas pucuk dan mata tunas ini banyak digunakan di berbagai laboratorium komersial. Perbanyakan jenis ini dapat dilakukan dengan dua cara yaitu:

a. Kultur pucuk (*Shoot tip culture*)

Perbanyakkan tanaman dengan menggunakan tunas lateral atau tunas terminal yang dekat dengan ujung. Panjang tunas ini kurang lebih 20 cm dari ujung. Biasanya pucuk apikal atau lateral yang mengandung jaringan yang meristematik akan lebih mudah untuk diregenerasikan (Bhojwani & Razdan, 1983).

b. Kultur mata tunas (*Single node culture*)

Perbanyakkan tanaman dengan menggunakan tunas aksilar sebagai eksplan. Teknik ini diterapkan pada bonggol pisang dan rimpang umbi-umbian seperti kunyit, jahe, pisang dan lain-lain (Bhojwani & Razdan, 1983).

3. Embriogenesis somatik

Embriogenesis somatik merupakan proses dimana sel-sel somatik (baik haploid dan diploid), berkembang membentuk tumbuhan baru melalui tahapan perkembangan embrio yang spesifik tanpa melalui fusi gamet. Jalur yang dilalui terdiri dari pembentukan kalus (pada embriogenesis tidak langsung), tahap pendewasaan dan tahap perkecambahan (pembentukan benih somatik) (Bhojwani & Razdan, 1983).

2.3 Induksi Kalus

Induksi kalus adalah salah satu teknik embriogenesis somatik tidak langsung untuk mengetahui embrio suatu tanaman induk secara *in vitro* (Rajamuddin *et al.*, 2010). Perkembangan embrio menjadi bibit melalui induksi eksplan bertujuan untuk menghasilkan filamen (Suryati *et al.*, 2015). Metode induksi kalus telah digunakan oleh Reddy *et al.* (2003) tentang *K. alvarezii* menggunakan kombinasi *indole-3-acetic acid* (IAA) dan *6-benzylaminopurine* (BAP) dengan beberapa perbandingan pada media kultur yang diperkaya media *Provasoli Enriched Seawater* (PES). Selain itu, Suryati *et al.* (2006) telah menunjukkan induksi kalus dan embrio dengan menggunakan media Conwy yang diperkaya dengan regulator pertumbuhan tanaman (ZPT) dari kombinasi IAA dan kinetin sebagai induktor.

Perlakuan eksplan dipindahkan pada media skrining berfungsi untuk proses adaptasi (aklimatisasi) dalam menyesuaikan eksplan rumput laut dengan lingkungan baru. Aklimatisasi merupakan proses yang penting dimana rumput laut hasil kultur jaringan secara perlahan menyesuaikan dengan perubahan lingkungan seperti suhu, kelembaban, fotoperiode dan pH. Kesuksesan proses aklimatisasi merupakan kunci penting untuk industri kultur jaringan rumput laut. Pemeliharaan rumput laut hasil kultur jaringan tanpa proses aklimatisasi dapat menyebabkan kematian rumput laut karena akan mengalami stres akibat perubahan kondisi lingkungan yang mendadak (Yong *et al.*, 2014).

Tahapan kultivasi dalam kultur jaringan pada rumput laut *K. alvarezii* sebagai berikut:

1. Preparasi media nutrisi

Media *semi-solid* dibuat dengan air destilasi ganda yang mengandung unsur makro, unsur mikro, asam amino, vitamin, sumber zat besi, sumber karbon disukai dan fitohormon. Wadah yang berisi media kultur kemudian disegel dan disterilkan dengan autoklaf (George, 1993).

2. Pembuatan kultur aseptik

Bahan awal untuk proses ini biasanya merupakan ujung tunas terminal tunas yang aktif tumbuh. Proses kultur jaringan dimulai dari pemilihan eksplan yang memiliki karakteristik diinginkan. Jaringan atau eksplan dipotong dicuci dengan air, dibilas dengan desinfektan dan disertai oleh pencucian air steril (George, 1993). Deterjen merupakan sterilan, desinfektan (pemutih) maupun juga sebagai surfaktan yang bersifat toksik dan tidak merusak jaringan pada tanaman. NaOCl atau *Bayclin* merupakan salah satu jenis deterjen NaOCl ketika dilarutkan dalam air akan mengikat logam, bahan aktif yang tidak dikenal dan akan terurai dalam bentuk gas klor, oksigen dan NaOH (George & Sheringlon, 1984).

Penambahan surfaktan dalam larutan menyebabkan turunnya tegangan permukaan larutan, setelah mencapai konsentrasi tertentu, tegangan permukaan akan konstan walaupun konsentrasi surfaktan ditingkatkan. Apabila surfaktan ditambahkan melebihi

konsentrasinya dan melakukan agregasi membentuk misel. Penggunaan sterilan ini penting untuk menghilangkan sisa-sisa bahan aktif, lemak dan kotoran atau noda-noda yang masih menempel dengan tujuan memperluas permukaan kontak antara bahan kimia (desinfektan) dengan bahan tanaman (Gennaro, 1990).

3. Pemilihan sumber eksplan

Pemilihan sumber eksplan dalam kultur jaringan sangat penting dilakukan untuk menunjang keberhasilan induksi kalus. Pemilihan bibit *K. alvarezii* yang digunakan dalam penelitian ini berdasarkan SNI Bibit Rumpun Laut Kotoni dengan kriteria sebagai berikut: persyaratan kuantitatif, yaitu berumur 25-30 hari, talus minimal bercabang 3, diameter talus utama minimal 0,5 cm dan seragam, berat per rumpun 50-10 g, sedangkan persyaratan kualitatif, yaitu talus tampak cerah dan segar, bersih dari kotoran, organisme penempel dan lumut, bebas penyakit, talus tidak luka dan patah, bertunas runcing dan bentuk proporsional (BSN, 2011). Bibit yang diperoleh dari lokasi tersebut dilakukan penyeleksian berdasarkan SNI Bibit Rumpun Laut untuk dijadikan sebagai aksesori dalam tahap aklimatisasi (Basyirah, 2017). Seleksi bibit tersebut bertujuan agar diperoleh tanaman dengan pertumbuhan yang baik dan hasil aklimatisasi yang optimal (Hidayat, 1994).

4. Inokulasi

Inokulasi dilakukan pada kondisi aseptik. Proses ini eksplan ditransfer ke media nutrisi yang disterilkan (Hanning & Conger, 1986). Proses pelukaan pada eksplan merupakan faktor yang mempengaruhi eksplan mengalami pencoklatan. Kerusakan ini diakibatkan oleh senyawa fenol yang terakumulasi pada sel kemudian mengalami oksidasi. Pertumbuhan kalus diawali dengan adanya pelukaan eksplan dan pembengkakan sel (Kartika *et al.*, 2014).

Pencoklatan terjadi diakibatkan oleh enzim oksidase yang mengandung senyawa fenol yang disintesis dalam kondisi oksidatif ketika diberi pelukaan. Luka eksplan mengakibatkan

terjadinya enzim dan substrat keluar dari sel kemudian terjadi ikatan antara hidrogen dengan protein yang diikuti dengan meningkatnya aktivitas *phenylalanine ammonia lyase* (PAL) yang memproduksi fenilpropanoid yang menyebabkan adanya pencoklatan (Hutami, 2008). Pembengkakan pada eksplan merupakan tahap awal pembentukan kalus yang mengindikasikan adanya sel mengalami proliferasi secara terus-menerus pada eksplan, diduga pembesaran pada sel yang terjadi sebagai aktifitas sel berupa penyerapan mengakibatkan eksplan mengalami pembengkakan. Respon pembengkakan terjadi karena adanya interaksi antara eksplan terhadap lingkungan tumbuh dan zat pengatur tumbuh melalui penyerapan nutrisi yang dilakukan oleh eksplan (Ajijah *et al.*, 2010).

5. Pertumbuhan pada ruang kultur

Botol disegel dan dipindahkan ke ruang pertumbuhan untuk memicu perkembangan di bawah cahaya (lampu pencahayaan 1000-2000 lux) pada suhu 20-25°C dan kelembaban relatif 50-60%. Persyaratan cahaya dan suhu bervariasi dari satu spesies ke spesies lain dan terkadang selama berbagai tahap perkembangan. Kultur diamati setiap hari untuk pertumbuhan dan tanda-tanda infeksi atau kontaminasi. Kultur yang sehat tumbuh menjadi tunas tunas kecil. Ini adalah subkultur pada media segar setelah 4 minggu (Hanning & Conger, 1986).

6. Perkembangan tunas

Kelembaban yang sangat tinggi di dalam bejana kultur dan perkembangan kondisi buatan, planletnya lunak dan kedepannya belum siap untuk menghadapi kondisi yang diajukan. Tunas yang dikeluarkan dari media steril dicuci dan ditutupi dengan plastik transparan (Leifert & Casella, 2001).

2.4 Eksplan

Eksplan adalah bagian dari tanaman yang digunakan sebagai bahan untuk inisiasi suatu kultur (Vidyasagar, 2006). Semua bagian tanaman yang dapat diperoleh dan bebas mikroorganisme dapat digunakan sebagai eksplan pada teknik kultur jaringan,

walaupun demikian tidak semua jaringan tanaman mudah ditumbuhkan. Keberhasilan morfogenesis dalam sebuah kultur jaringan, salah satunya ditentukan oleh eksplan (Wareing & Phillips, 1976).

2.5 Media Kultur

Keberhasilan dalam metode kultur jaringan sangat tergantung pada media yang digunakan (Gunawan, 1987). Unsur-unsur yang penting dalam media tersebut adalah garam-garam anorganik, vitamin, zat pengatur tumbuh, sumber energi, dan karbon. Garam-garam anorganik terdiri dari unsur-unsur hara yang esensial. Unsur hara esensial adalah unsur hara yang diperlukan oleh tanaman untuk menyelesaikan siklus hidupnya, fungsi unsur hara tersebut tidak dapat digantikan oleh unsur yang lain, dan diperlukan dalam proses metabolisme tanaman sebagai komponen molekul anorganik atau sebagai kofaktor dalam reaksi enzim (Orcutt & Nilsen, 2000).

Provasoli Enriched Seawater (PES) adalah salah satu media dasar (*marine medium*) khusus alga yang terdapat komponen organik dan anorganik dan digunakan pada metode kultur steril rumput laut. Komposisi bahan-bahan media PES terdiri dari campuran TRIS *base* yang memiliki fungsi sebagai penyeimbang (*buffer*) pH, NaNO_3 sebagai sumber nitrat, $\text{Na}_2\text{b-glycerophosphate}$ sebagai logam, larutan *stok trace metals* sebagai logam untuk metabolisme, larutan *stok thiamine* (Vit. B1) sebagai koenzim katabolisme, larutan *stok biotin* sebagai pengatur transfer CO_2 dalam metabolisme karbohidrat dan lemak, dan larutan *stok cyanocobalamin* (Vit. B12) (Harrison & Berges, 2004).

Penggunaan komponen yang mengandung logam pada media PES adalah sebagai detoksifikasi dan membantu menghilangkan radikal bebas oksigen pada reagen yang tercampur garam tinggi dan cenderung mengandung toksik yang signifikan serta untuk menghindari masalah tertentu dari kopresipitasi ion karena pasteurisasi atau autoklaf, namun ada metode yang tersedia untuk

menurunkan pH selama proses autoklaf untuk mencegah pengendapan (Harrison *et al.*, 1980). Penggunaan buffer seperti TRIS juga dapat membantu mengendalikan pH dan mencegah presipitasi (Keller *et al.*, 1987). Pupuk PES baik digunakan pada pertumbuhan *mikroalgae* dan nutriennya dapat dimanfaatkan pada kultur *makroalgae* seperti *K. alvarezii*. Kepadatan media agar berpengaruh terhadap sintasan eksplan yang dikultur secara *in vitro*, penyerapan nutrisi pada media padat sangat dipengaruhi oleh porositas dan kekenyalan dari media tersebut sehingga nutrisi dapat terserap dan dapat dimanfaatkan oleh eksplan yang dikultur (Suryati & Mulyaningrum, 2009).

2.6 Antibiotik

Antibiotik ialah zat yang dihasilkan oleh mikroorganisme atau dihasilkan secara sintetik yang dapat membunuh dan menghambat perkembangan mikroorganisme sehingga memperlihatkan toksisitas secara selektif (Copra & Roberts, 2001). Penisilin G merupakan antibiotik yang berfungsi menghambat sintesis dinding sel sehingga terjadi kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis, streptomisin berfungsi untuk menghambat sintesis protein sel mikroba yang menyebabkan terbentuknya protein yang abnormal dan nonfungsional bagi sel mikroba. Sifat antibiotik dapat berbeda satu dengan lainnya. Misalnya, penisilin G bersifat aktif terhadap bakteri gram positif, sedangkan gram negatif pada umumnya resisten terhadap penisilin G. Streptomisin memiliki sifat berbanding terbalik dengan penisilin G (Chudobova *et al.*, 2014).

Povidone iodine termasuk dalam kelompok bahan aktif farmasi yang digunakan dalam produk farmasi yang biasa disebut antiseptik. *Povidone* (*polyvinylpyrrolidone*, yang disintesis dalam tahapan dari asetilena adalah polimer polivinil dengan panjang rantai yang berbeda; digunakan sebagai agen suspensi dan dispersi (Kramer *et al.*, 2006). Yodium memiliki aktivitas mikrobisida yang tinggi. Kandungan sifat mikrobisida

diakibatkan karena adanya pelepasan unsur yodium. Faktor penentu untuk efek mikrobisida penting adalah reaksi yodium bebas menekan pada dinding sel dengan organisme target, *povidone* mengikat dengan cepat ke dinding sel dan memastikan bahwa zat aktif tersebut diangkut ke sisi aktif sehingga proses metabolisme akan terganggu oleh pengikatan yodium dan mikroorganisme dengan demikian tidak aktif (Gottardi, 2001).

2.7 Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh atau *plant regulator* adalah senyawa organik yang bukan hara, yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat mengubah proses fisiologi tumbuhan (Abidin, 1993). Istilah zat pengatur tumbuh (hormon) dapat diartikan sebagai zat kimia yang dibuat dalam suatu bagian tanaman tertentu, tetapi mempengaruhi bagian lain dari tanaman tersebut (Darmawan & Baharsjah 2010). Menurut Wattimena (1992), zat pengatur tumbuh dari golongan auksin berperan antara lain dalam pembentukan kalus, morfogenesis akar dan tunas serta embriogenesis, sedangkan sitokinin berperan untuk mengatur transpor auksin dalam morfogenesis dan pertumbuhan melalui pembelahan sel. Konsep ZPT diawali dari konsep hormon. Hormon tanaman atau fitohormon adalah senyawa-senyawa organik tanaman yang dalam konsentrasi rendah mempengaruhi proses-proses fisiologis terutama mengenai pertumbuhan, diferensiasi, dan perkembangan (Widyaiswara, 2005)

Menurut Torres (1989) bahwa zat pengatur tumbuh yang penting untuk kultur jaringan tanaman antara lain adalah auksin dan sitokinin. Auksin berperan dalam meningkatkan tekanan osmotik, permeabilitas sel, mengurangi tekanan pada dinding sel, meningkatkan sintesis protein, serta menstimulus pemanjangan dan pembesaran sel (Taiz & Zeiger, 2002). Berdasarkan suatu hipotesis yang disebut hipotesis pertumbuhan asam (acid growth hypothesis), golongan auksin berperan dalam pembesaran sel. Zat pengatur tumbuh golongan auksin dapat memicu pompa proton untuk meningkatkan jumlah H^+ ke dalam sel sehingga sitoplasma

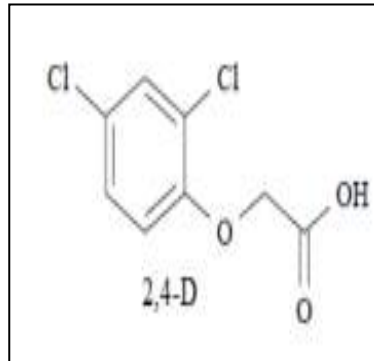
sel menjadi lebih asam kemudian menyebabkan melonggarnya ikatan polisakarida pada dinding sel sehingga air dengan mudah berosmosis ke dalam sel dan menyebabkan sel mengalami pembesaran.

Sitokinin berperan dalam pembelahan sel, modifikasi dominansi apikal dan diferensiasi tunas (Widiastoety, 2014). Kombinasi zat pengatur tumbuh antara auksin dengan sitokinin akan menstimulus pembelahan sel dan memengaruhi lintasan diferensiasi (Fonnesbech, 1992). Menurut Gaspar *et al.* (1996) bahwa interaksi auksin dan sitokinin dianggap penting untuk mengatur pertumbuhan dan perkembangan dalam jaringan tanaman dan kultur organ, karena kedua kelas hormon tersebut umumnya diperlukan oleh tumbuhan. Auksin dan sitokinin eksogen yang ditambahkan akan berinteraksi dengan hormon endogen tanaman.

Konsentrasi sitokinin yang lebih tinggi daripada auksin dapat menstimulasi pembelahan sel, dengan meningkatkan sintesis protein dan aktifitas metabolisme yang meningkatkan proses diferensiasi sel. Kombinasi auksin dan sitokinin mampu menstimulasi regenerasi filamen rumput laut menjadi tunas pada media cair serta memiliki peran regulasi dalam pertumbuhan dan morfogenesis (Yokoya & Handro, 1996; Yokoya *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2003). Beberapa golongan auksin adalah IAA (*indole-3-acetic acid*), PAA (*phenylacetic acid*) dan IBA (*indole-3-butyric acid*). Beberapa lainnya merupakan auksin sintetik, misalnya NAA (*alpha-naphthaleneacetic acid*), 2,4 D (*2,4-dichloro phenoxyacetic acid*) dan MCPA (*2-methyl-4-chloro phenoxyacetic acid*), sedangkan yang termasuk dalam golongan sitokinin antara lain BAP (*6-benzylaminopurine*), kinetin (*6-furfurylamino purine*), dan lain-lain (Hartmann *et al.*, 1990).

Zat Pengatur Tumbuh 2,4 D merupakan salah satu golongan auksin yang efektif untuk induksi kalus embriogenik dan mempunyai daya aktivitas kuat, tetapi pada konsentrasi rendah dapat menginduksi endosperma kalus (Thomas & Chaturvedi 2008). Selain itu, 2,4-D juga berfungsi menghambat respon

hormon tanaman, mampu menyebabkan luka dan kerusakan tanaman seperti tangkai batang dan petiola, malformasi daun dan daun menggulung (Vicente & Yolanda, 2004).



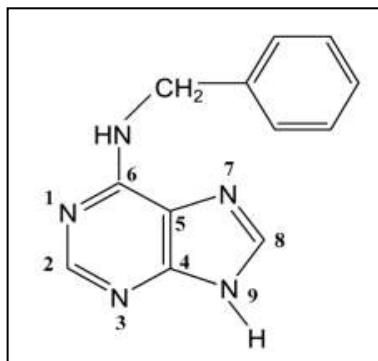
Gambar 2.4 Struktur Kimia 2,4-D (Qurratu & Reehan, 2016).

Nama kimia pada 2,4-D adalah *2,4-dichlorophenoxyacetic acid* (APVMA, 2006). 2,4-D merupakan sebuah padatan kristal putih dengan formula kimia $C_8H_6Cl_2O_3$, termasuk asam non volatil dan diklasifikasikan sebagai kategori karsinogen D (Farah et al., 2004). 2,4-D juga dalam bentuk garam asam, basa dan amina bebas dan formulasi ester. Bobot molekul untuk 2,4-D adalah 221,0 g/mol (EPA, 2005).

Zat pengatur tumbuh ini bersifat stabil pada suhu yang tinggi, sangat reaktif dan efektif pada konsentrasi yang rendah dan aktif dalam waktu yang lama serta paling sering digunakan untuk induksi kalus dan pertumbuhan kalus karena efektif untuk tahap inisiasi khususnya pada jaringan yang belum dewasa (Ayuningrum *et al.*, 2015). 2,4-D yang digunakan dalam konsentrasi yang rendah juga dapat mendorong pembelahan sel, mendorong pertumbuhan tanaman dan meningkatkan daya kecambah benih (Wattimena, 2001). Syahid & Hernani (2001), menambahkan bahwa 2,4-D mampu merangsang pembentukan kalus. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian 2,4-D

berpengaruh terhadap panjang diameter kalus yang tumbuh, hal tersebut dikarenakan zat pengatur tumbuh yang terkandung dalam media kultur *in vitro* akan mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Selanjutnya semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang diberikan hingga 3 mg/l dalam kultur kalus, maka pertumbuhan kalusnya akan semakin meningkat (Jonwaldinson, 2010).

Zat pengatur tumbuh *6-Benzylaminopurine* atau disebut dengan BAP merupakan salah satu sitokinin sintetik yang dapat meningkatkan respon pertumbuhan dan perkembangan tanaman, pembungaan dan pematangan buah yang distimulus oleh pembelahan sel. (Siddiqui *et al.*, 2011). BAP berasal dari turunan adenin dan tersubstitusi pada gugus amino pada posisi 6. Nama kimia BAP adalah $C_{12}H_{11}N_5$ (Da Silva, 2012). Selain itu, BAP juga berfungsi sebagai penghambat respirasi kinase pada tanaman dan meningkatkan umur panen sayuran hijau. BAP ini umumnya digunakan dalam kultur jaringan serta banyak digunakan menanamkan media pertumbuhan seperti media Murashige and Skoog (MS), media Gamborg dan media Chu N6 (Li, 2006).



Gambar 2.5 Struktur Kimia BAP (Li, 2006).

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2017 hingga Juni 2018 di Laboratorium Biosains dan Teknologi Tumbuhan Departemen Biologi, Fakultas Ilmu Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember serta Laboratorium Kultur Jaringan Rumput Laut, Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Instalasi Blitok, Situbondo.

3.2 Metode yang Digunakan

Metode secara *in vitro* digunakan untuk mengetahui respon pertumbuhan kalus. Persiapan talus rumput laut *K. alvarezii* diawali dari sampling di beberapa titik perairan Sumenep salah satunya *K. alvarezii* yang diambil dari pesisir pantai Pagar Batu, Kecamatan Saronggi, Kabupaten Sumenep. Persiapan eksplan meliputi persiapan media kultur semi steril, yaitu media PES (*Provasoli Enriched Seawater*), 2,4-D serta BAP. Kalus yang terbentuk selanjutnya diinduksi dan disubkultur. Pengamatan eksplan dilakukan antara lain persentase terbentuknya kalus dan visual struktur kalus. Diagram alur penelitian diilustrasikan pada Lampiran 1.

3.2.1 Sterilisasi Alat dan Botol Kultur

Botol kultur awalnya dicuci dengan menggunakan deterjen selama kurang lebih 24 jam dan dibilas dengan air mengalir. Alat-alat yang digunakan untuk penanaman harus dalam kondisi steril. Alat-alat logam dan gelas dapat disterilkan dalam autoklaf. Alat tanam seperti pinset dan gunting dapat juga disterilkan dengan pembakaran atau dengan pemanasan dalam oven. Botol kultur dimasukkan ke dalam autoklaf untuk sterilisasi pada suhu 121°C, tekanan sebesar 1 atm selama 15 menit.

3.2.2 Pembuatan media

Persiapan media sebanyak 20 ml larutan media kultur PES (*Provasoli Enriched Seawater*) dimasukkan dalam gelas beaker. Konsentrasi 2,4-D dan BAP yang digunakan meliputi 0 mg/l (kontrol); 3 mg/l; dan 5 mg/l. Pemilihan konsentrasi dan jenis auksin ditentukan antara lain oleh tipe pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang dikehendaki. Air laut steril ditambahkan ke dalam gelas beaker hingga volume larutan mencapai 1000 ml atau 1 L. Larutan media diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen, ditambahkan media PES sebanyak 20 ml/l, diatur pH larutan media menggunakan pH meter hingga 5,8, jika pH terlalu asam ditambahkan larutan NaOH dan apabila terlalu basa ditambahkan larutan HCl. Media selanjutnya dipindahkan ke dalam gelas ukur dan ditambahkan dengan akuades hingga volume mencapai 1000 ml, dituang ke dalam labu erlenmeyer, ditambahkan *bacto agar* sebanyak 8 g/L. Media kemudian dipanaskan pada *hot plate* menggunakan *magnetic stirrer* sekitar 10-15 menit hingga mendidih kemudian dipindahkan ke wadah larutan media untuk dituang ke dalam botol kultur. Sebelumnya, botol kultur ditutup dengan aluminium foil atau tutup botol khusus kultur dengan rapat dan dilakukan sterilisasi ke dalam oven sampai suhu 150°C.

3.2.3 Pemilihan Bibit *K. alvarezii*

Sampel bibit rumput laut diambil dari pesisir pantai Pagarbatu, Kecamatan Saronggi, Kabupaten Sumenep. Rumput laut yang diambil kemudian dimasukkan ke dalam kotak kardus (*sterofoam*) atau *coolbox* dalam kondisi cukup basah agar tetap segar selama perjalanan ke Surabaya. Pengemasan sampel bibit dilakukan dengan metode semi kering dengan cara dibungkus kertas koran bekas dan disimpan di dalam *coolbox* bertujuan agar tetap segar selama perjalanan ke tempat aklimatisasi (Sulistiani dan Yani, 2014). Setiap dua rumpun rumput laut ditempatkan terpisah satu sama lain di kotak, sementara koran tua digunakan

sebagai partisi. Kotak kardus ditutup dan dimasukkan ke dalam karung yang diikat menggunakan rafia dan untuk mengurangi angka kematian pada saat budidaya semi steril di laboratorium.

3.2.4 Preparasi Eksplan

Preparasi eksplan dalam penelitian ini dilakukan pada area *Laminar Air Flow Cabinet* (LAF) dalam kondisi steril, dimulai dari bagian talus cabang 1 (primer) dipilih dari kultur semi steril untuk digunakan sebagai eksplan induksi kalus. Eksplan diambil dari umur 1 bulan atau 30 hari, dipotong-potong dengan rata-rata panjang 1-2 cm dan dicuci dengan air laut steril sebanyak 2 kali serta disterilisasi sebanyak 270 eksplan.

Eksplan direndam dalam antibiotik (100 mg/l penisillin G dan 100 mg/l streptomisin sulfat) selama 15 menit. Eksplan dicuci dengan air laut yang disterilkan, dan dikeringkan dengan kertas tissue steril kemudian ditanam di media PES yang dipadatkan dengan bacto agar 8 g/l. Eksplan kemudian direndam dalam *povidone iodine* atau *betadine* sebesar 0,5 ml dalam 100 ml air laut steril selama 3 menit dan dibilas kembali sebanyak dua kali dengan air laut steril. Pengamatan dilakukan untuk mencatat kondisi eksplan dan persentase eksplan yang bertahan hidup dan terkontaminasi (Muñoz, 2006).

3.2.5 Induksi Kalus

Eksplan ditanam pada media PES sebanyak 20 ml dalam 1000 ml air laut sintetik steril. Penanaman eksplan dilakukan di *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC). Media dipadatkan dengan 0,8% *bacto agar* untuk mengetahui media kultur dasar yang optimal. Masing-masing media ini terdapat kombinasi antara zat pengatur tumbuh seperti 2,4-D dan BAP ditambahkan. Konsentrasi 2,4-D dan BAP meliputi 0 mg/l (kontrol); 3 mg/l; dan 5 mg/l. Setiap perlakuan dilakukan dengan 3 ulangan.

Awalnya eksplan ditanam pada media skrining selama 7 hari (1 minggu). Eksplan yang telah diamati pada media PES skrining (tanpa penambahan zat pengatur tumbuh) dan tidak

terkontaminasi digunakan sebagai eksplan untuk induksi kalus, kemudian dipindahkan ke dalam media PES dengan penambahan zat pengatur tumbuh. Kultur disimpan di ruang kultur selama 2 bulan (60 hari) dengan suhu kamar antara 22-25° C, kelembaban relatif 60-70% serta intensitas cahaya (fotoperiode) dengan 12 jam terang dan 12 jam gelap.

3.2.6 Pengamatan Kalus

- **Persentase Terbentuknya Kalus**
Menurut Sitorus *et al.* (2011) menyatakan bahwa rumus perhitungan pada persentase terbentuknya kalus (sintasan) yaitu:

$$SR = N_t / N_0 \times 100\%$$

dimana :

SR = Persentase Terbentuknya Kalus (Sintasan)

N_t = Jumlah eksplan membentuk kalus

N_0 = Jumlah eksplan ditanam

- **Struktur Kalus**
Indikator pertumbuhan eksplan pada *in vitro* berupa warna kalus menggambarkan penampilan visual kalus sehingga dapat diketahui suatu kalus masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau telah mati. Perkembangan kalus yang terbentuk diamati dengan menggunakan mikroskop. Gambar kalus dipotret dengan kamera digital (Optika Microscopes CCD Sensor) yang ditampilkan pada layar monitor. Jaringan kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan biasanya memunculkan warna yang berbeda-beda. Kualitas kalus yang baik memiliki warna yang hijau. Menurut Fatmawati (2008), warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya. Warna terang atau putih mengindikasikan bahwa kondisi kalus masih cukup baik. Pengamatan warna kalus pada penelitian ini mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Andaryani (2010) yaitu dengan

mengamati secara visual. Penentuan warna kalus ditetapkan berdasarkan skoring yang ditunjukkan pada Tabel 3.1

Tabel 3.1 Skoring Pengamatan Warna Kalus

No	Skoring	Keterangan
1	0	Coklat
2	1	Putih
3	2	Hijau keputihan
4	3	Hijau kekuningan
5	4	Hijau
6	5	Hijau kecoklatan
7	6	Kuning

Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang digunakan untuk menilai kualitas suatu kalus. Kalus yang baik diasumsikan memiliki tekstur remah (*friable*). Tekstur kalus yang remah dianggap baik karena memudahkan dalam pemisahan menjadi sel-sel tunggal pada kultur suspensi serta akan meningkatkan aerasi oksigen antar sel. Tekstur kalus dapat dibedakan menjadi tiga macam, yaitu: kompak (*non friable*), intermediet dan remah (*friable*) (Turhan, 2004).

Pembentukan kalus remah ditandai dengan tekstur lunak dan tersusun dari sel-sel dengan ruang antar sel yang banyak dan tampak renggang serta mudah dipisahkan dengan pinset, mudah pecah dan ada yang menempel pada pinset (Sugiyarto & Paramita, 2014). Kalus kompak mempunyai tekstur yang sulit untuk dipisahkan dan terlihat padat (Fitriani, 2008). Sedangkan kalus yang sebagian bertekstur kompak dan remah disebut kalus intermediet (Widiarso, 2010).

3.3 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Penelitian ini diatur dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola faktorial yang terdiri dari 2

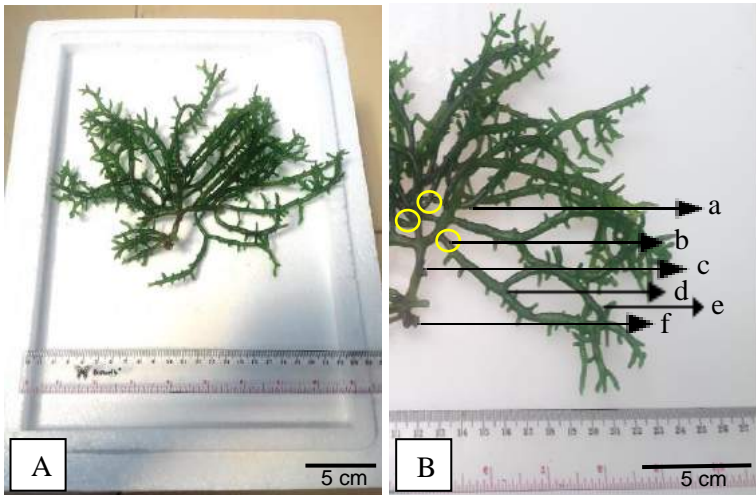
faktor dengan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Pengamatan dilakukan tiap minggu untuk induksi kalus. Analisis data menggunakan uji ANOVA *Two Way*, apabila terdapat pengaruh yang berbeda nyata maka dilakukan uji Tukey dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 5\%$).

Teknik analisis data menggunakan kuantitatif dan kualitatif. Data kuantitatif maupun kualitatif diinventarisasi, diolah serta dianalisis secara sistematis. Analisis data kuantitatif menggunakan perbandingan dengan pendekatan deskriptif. Data kualitatif dianalisis dengan pendekatan teoritis. Data kualitatif yaitu skoring terhadap respon morfogenesis struktur kalus yang ditampakkan dan persentase terbentuknya kalus diinterpretasikan secara deskriptif. Data kuantitatif pada pembentukan kalus yaitu persentase terbentuknya kalus.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pemilihan Rumput Laut *K. alvarezii* sebagai Sumber Eksplan pada Induksi Kalus

Pemilihan rumput laut *K. alvarezii* sebagai sumber eksplan dalam kultur jaringan sangat penting dilakukan untuk menunjang keberhasilan induksi kalus. Yusnita (2003) menyatakan bahwa terdapat tiga faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur jaringan, yaitu pemilihan sumber eksplan, lingkungan kultur dan kombinasi jenis media serta zat pengatur tumbuh (ZPT) yang digunakan. Berikut karakter morfologi rumput laut *K. alvarezii* dalam menentukan sebagai sumber eksplan dapat dilihat pada Gambar 4.1



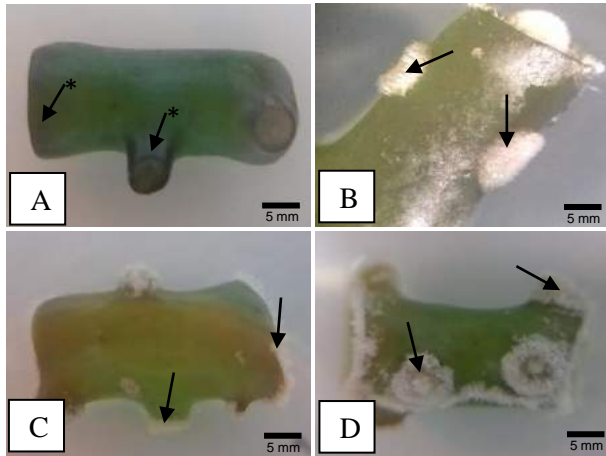
Gambar 4.1. Karakter Morfogi *K. alvarezii* (A). Rumput Laut *K. alvarezii*, (B). Bagian-Bagian Rumput Laut *K.alvarezii* (a) Internodus Talus Sekunder, (b) Talus Utama, (c) Talus Cabang 1 (Talus Primer), (d) Internodus Talus Tersier, (e) Talus Cabang 2 (Talus Sekunder) dan (f) *Holdfast*. Keterangan: tanda lingkaran (○) berwarna kuning menunjukkan bagian talus yang dipilih sebagai bahan tanam eksplan.

Pemilihan bahan tanam (eksplan) yang tepat merupakan faktor yang harus diperhatikan dalam perbanyakan secara *in vitro*. Eksplan yang baik untuk kultur jaringan adalah eksplan yang berasal dari bagian jaringan yang masih aktif membelah. Pada eksplan yang berasal dari jaringan yang aktif membelah lebih cepat mengalami diferensiasi untuk membentuk kalus maupun tunas. Terbentuknya kalus dan tunas juga dipengaruhi oleh faktor zat pengatur tumbuh dalam media tanam (Marlina, 2009).

Bagian talus rumput *K. alvarezii* yang dijadikan sebagai calon eksplan ialah talus cabang 1 atau disebut juga talus primer seperti yang tampak pada Gambar 4.1. Talus primer digunakan sebagai eksplan karena keberadaan jaringan meristem yang aktif melakukan pembelahan dan diferensiasi sel. Bagian ini memiliki titik tumbuh yang banyak berupa jaringan meristem (sel-sel muda) yang selalu aktif membelah meskipun bagian tengah talus cenderung lebih lambat pertumbuhannya dibandingkan bagian apikal talus. Selain itu, diperlukan pemotongan ukuran diameter dengan luas permukaan eksplan yang sesuai agar dapat menyerap nutrisi dengan mudah sehingga mampu untuk tumbuh serta berkembang membentuk sel kalus meskipun pada bagian talus ini terdapat sebagian besar jaringan meristem terbentuk oleh sel-sel muda yang aktif membelah (Kumar *et al.*, 2007). Menurut Sutrian (2004) bahwa dilihat dari struktur anatomi talus, jaringan muda atau meristem dapat terjadi dari sel-sel muda (*initiating cell*) yang bersifat meristematis.

4.2 Tahap Pembentukan Kalus Rumput Laut *K. alvarezii*

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil pembentukan kalus rumput laut *K. alvarezii* yang ditunjukkan pada Gambar 4.2



Gambar 4.2 Pembentukan Kalus pada Eksplan Rumpun Laut *K. alvarezii* Selama 60 Hari Pemeliharaan pada Perlakuan 2,4-D 3 mg/l+BAP 0 mg/l (A) Eksplan belum mulai terbentuk kalus disertai dengan perubahan pigmentasi, (B) Kalus mulai terbentuk pada bagian tengah (medular), (C) Kalus mulai terbentuk pada bagian permukaan (kortikal), (D) Kalus terbentuk hampir menutupi seluruh permukaan (kortikal) dan tengah (medular) pada eksplan rumput laut *K. alvarezii*. Keterangan: Pengamatan menggunakan mikroskop stereo dengan perbesaran 40x dan skala bar 5 mm).

Gambar 4.2 (A) menunjukkan bahwa pembentukan kalus dimulai dengan perubahan pigmentasi pada permukaan eksplan (kortikal) kemudian terbentuk kalus pada area bagian eksplan yang terluka yaitu bagian tengah (medular) dan lapisan kortikal. Perubahan pigmentasi ditandai dengan bagian tepi permukaan eksplan berwarna coklat tua (talus semakin lama berwarna gelap) dan mengalami pembengkakan pada bagian medular maupun kortikal eksplan kemudian tumbuh tonjolan kecil berbentuk serabut yang berada di tepi eksplan yang berwarna putih dan membentuk kristal hingga menutupi seluruh permukaan eksplan. Perubahan pigmentasi ini terjadi disebabkan berkurangnya pigmen hijau (klorofil) (Rahayu *et al.*, 2003).

Respon pembengkakan eksplan terjadi karena disebabkan adanya interaksi antara eksplan terhadap lingkungan tumbuh dan zat pengatur tumbuh dalam melakukan aktifitas sel seperti terjadi penebalan dinding talus (lignifikasi) terutama pada bagian yang memiliki pigmen (Henuhili, 2012). Adanya luka pada eksplan menyebabkan ZPT eksogen lebih mudah berdifusi ke dalam jaringan dan bekerja sama dengan ZPT endogen untuk membentuk kalus dengan menstimulasi pembelahan sel terutama pada area luka (Permadi *et al.*, 2014). Hal tersebut sesuai dengan penelitian Munõz *et al.* (2006) dan Hayashi *et al.* (2006) yang mendapatkan terbentuknya kalus *K. alvarezii* dimulai dengan perubahan pigmentasi pada daerah permukaan eksplan (kortikal) kemudian terbentuk filamen yang tidak terdiferensiasi pada eksplan dan berkembang menjadi tunas (Rorrer & Cheney, 2004).

Inisiasi pembentukan kalus terjadi karena adanya pelukaan pada permukaan eksplan sehingga sel akan membengkak dan terjadi pembelahan sel hingga membentuk kalus. Menurut Fowler (1983) pembentukan kalus terjadi karena proses pelukaan atau rangsang luka yang diberikan sehingga menyebabkan sebagian protoplas mengalir ke luar dinding sel dan membentuk kalus ditandai dengan peristiwa pencoklatan. Peristiwa ini terjadi sebagai akibat dari tingginya kandungan senyawa fenolik yang terbentuk serta menutupi permukaan kalus. Eksplan mengalami pencoklatan disebabkan oleh senyawa fenolik yang biasanya muncul dan terakumulasi ketika eksplan dilukai. Pelukaan pada eksplan dapat menyebabkan kehilangan integritas membran sel yang dapat memicu akumulasi dari senyawa polifenol yang berlebihan dan menyebabkan terjadinya proses pencoklatan (*browning*) (Ru *et al.*, 2013; Mellidou *et al.*, 2014).

Selain itu, adanya pemberian zat pengatur tumbuh auksin (2,4-D) dan sitokinin (BAP) pada permukaan eksplan menjadi faktor yang mempengaruhi eksplan mengalami pertumbuhan kalus. 2,4-D merupakan auksin sintetik yang paling sering digunakan untuk menginduksi kalus dan suspensi sel (Sudrajad *et al.*, 2016). Sedangkan BAP ialah jenis sitokinin yang aktif

merangsang pertumbuhan kalus, serta regenerasi kalus maupun tunas (Wiendi *et al.*, 1991).

4.3 Struktur Kalus

Struktur kalus secara visual ditandai dengan pengamatan skoring warna pada kalus dan pengamatan mikroskop yang ditunjukkan pada Tabel 4.1. dan Gambar 4.3

Tabel 4.1 Skoring Warna pada Kalus dengan Perlakuan Kombinasi ZPT 2,4-D dan BAP

2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)		
	0	3	5
0	1 (Putih)	1 (Putih)	1 (Putih)
3	1 (Putih)	1 (Putih)	1 (Putih)
5	1 (Putih)	1 (Putih)	1 (Putih)

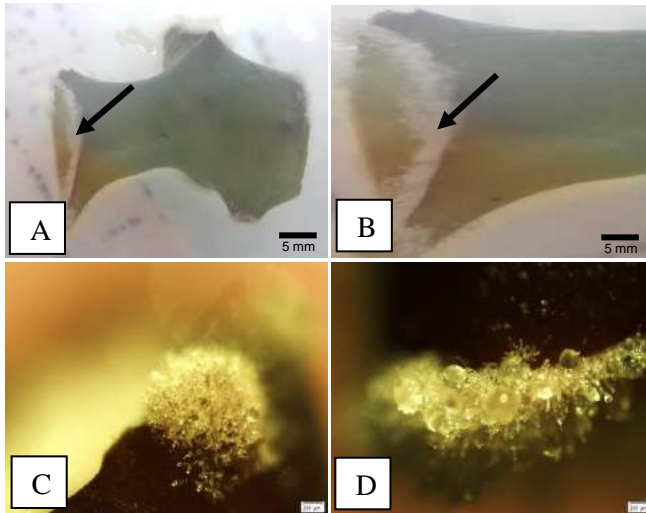
Keterangan: Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D dan BAP dalam bentuk (mg/l)

Tabel 4.1 menunjukkan bahwa pengamatan skoring warna dari masing-masing perlakuan kontrol maupun penambahan 2,4-D serta BAP terlihat menunjukkan warna putih pada kalus yang terbentuk selama 60 hari pemeliharaan. Kalus berwarna putih ditandai dengan skoring 1. Warna putih pada pengamatan skoring ini menunjukkan bahwa kondisi kalus masih cukup baik. Fatmawati (2008) menyatakan bahwa warna terang atau putih maupun kuning mengindikasikan kondisi kalus masih cukup baik.

Kalus dapat dibedakan dalam beberapa tipe morfologi yang bervariasi sesuai dengan penampilan warna dan teksturnya. Kalus secara umum diklasifikasikan menjadi kalus embriogenik, kalus proliferaatif dan kalus *senescens* (Kesee *et al.*, 1991 dalam Sugiyono, 1993). Hasil pengamatan yang diperoleh sesuai penelitian Ayuningrum *et al.* (2015) menyatakan bahwa tipe kalus embriogenik yaitu ukuran sel kalus besar, berwarna putih kehijauan dan tumbuh cepat. Tipe kalus proliferaatif yaitu ukuran sel kalus kecil berwarna putih kekuningan. Tipe kalus *senescens*

yaitu kalus yang terbentuk berwarna coklat kehitaman dan tidak menunjukkan perkembangan kalus (mengalami kematian).

Berikut pengamatan warna dan struktur kalus pada eksplan rumput laut *K. alvarezii* dilihat pada Gambar 4.3



Gambar 4.3 Pengamatan Skoring Warna Kalus pada Eksplan Rumput Laut *K. alvarezii* dengan Perlakuan 2,4-D 3 mg/l+BAP 3 mg/l (A) Warna Putih pada Kalus, (B) Perbesaran (*zoom*) dari Gambar A Warna Putih pada Kalus, (C) Kalus tampak berbentuk kristal dan (D) Perbesaran (*Zoom*) dari Gambar C pada kalus berbentuk kristal. Keterangan: Pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x; skala bar 5 mm pada Gambar 4.3 (A) dan (B); perbesaran 100x; skala bar 200 µm pada Gambar 4.3 (C) dan (D).

Gambar 4.3 (A) dan (B) menunjukkan warna putih pada kalus yang berbentuk serabut dan tersusun secara rapat tumbuh pada bagian tepi kortikal eksplan bahwa diduga sel kalus masih melakukan tahapan inisiasi pembelahan dan terdiri dari sel-sel muda sehingga tidak dapat mencapai pada tahap regenerasi kalus karena ukuran kalus masih kecil dan tekstur kalus seperti bersifat kompak (*non friable*) yang sulit dipisahkan dengan pinset dan

mudah rusak serta struktur kalus terlihat rapat sehingga belum mampu dilakukan pemisahan (subkultur). Sulistiani *et al.* (2010) menyatakan bahwa terdapat beberapa tipe kalus terbentuk pada induksi kalus rumput laut *K. alvarezii*, yaitu: kalus kompak berwarna putih, kalus berwarna putih dengan struktur filamen (*filamentous callus*), kalus bening berwarna kehijauan atau kecoklatan. Kalus yang baik diasumsikan memiliki tekstur remah (*friable*). Tekstur kalus yang remah dianggap baik karena memudahkan dalam pemisahan menjadi sel-sel tunggal pada kultur *in vitro* dan meningkatkan aerasi oksigen antar sel (Turhan, 2004).

Gambar 4.3 (C) dan (D) menunjukkan kalus yang awalnya berbentuk serabut dan berwarna putih diduga berbentuk kalus berfilamen (*filamentous callus*) dengan karakteristik bahwa filamen tersusun dalam satu baris atau tidak tersusun bercabang-cabang (*uniseriate*) dan berpigmen yang mengacu penelitian Zitta *et al.* (2013) menyatakan bahwa kalus yang diproduksi pada media padat *semi-solid* merupakan kalus berfilamen (*filamentous callus*). Kalus berfilamen terbentuk dari dediferensiasi sel medular dan kortikal, serta pembelahan sel secara berturut sehingga menghasilkan kalus filamen di seluruh eksplan. Filamen kalus pada bagian permukaan eksplan mengindikasikan berasal dari pembelahan sel baik pada bagian kortikal dan medular (Zitta *et al.*, 2013).

Yokoya (2000) menyatakan kalus dengan bentuk gelembung bersifat kalus filamen dan bentuk rapat dengan memanjang dan beberapa sel berpigmen yang dihasilkan dari pembelahan sel pada bagian kortikal dan medular eksplan. Menurut Munõz *et al.* (2006), eksplan *K. alvarezii* memproduksi kalus berbentuk kristal dan kalus berpigmen. Sedangkan menurut Kumar *et al.* (2007) pada *K. alvarezii* didapati kalus dalam dua bentuk yaitu kalus berserabut yang terbentuk pada pusat potongan eksplan dan kalus yang berbentuk gelembung-gelembung.

4.4 Respon Pembentukan Kalus

Berikut hasil persentase terbentuknya kalus (sintasan) yang telah dianalisis menggunakan uji ANOVA Two Way ditunjukkan pada Tabel 4.2

Tabel 4.2. Hasil Persentase Eksplan Berkalus pada Kultur Rumput Laut *K.alvarezii* pada Berbagai Kombinasi ZPT

No	Kombinasi	Persentase Terbentuknya Kalus (Sintasan)
1	2,4-D 0 mg/l+BAP 0 mg/l	36,67
2	2,4-D 0 mg/l+BAP 3 mg/l	26,67
3	2,4-D 0 mg/l+BAP 5 mg/l	20
4	2,4-D 3 mg/l+BAP 0 mg/l	56,67
5	2,4-D 3 mg/l+BAP 3 mg/l	40
6	2,4-D 3 mg/l+BAP 5 mg/l	30
7	2,4-D 5 mg/l+BAP 0 mg/l	26,67
8	2,4-D 5 mg/l+BAP 3 mg/l	16,67
9	2,4-D 5 mg/l+BAP 5 mg/l	16,67

Keterangan: Nilai yang ditampilkan adalah perlakuan sebanyak tiga kali ulangan dengan ditunjukkan mean (rata-rata).

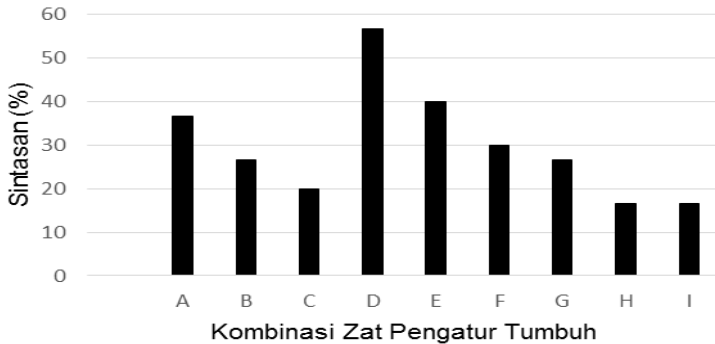
Tabel 4.2 menyatakan hasil uji keragaman ANOVA *Two Way* menunjukkan bahwa kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-D maupun BAP memiliki nilai yang tidak signifikan terhadap sintasan sehingga tidak berpengaruh nyata terhadap persentase terbentuknya kalus ($P>0,05$). Nilai rata-rata pembentukan kalus mengalami penurunan seiring meningkatnya konsentrasi 2,4-D dan BAP. Nilai rata-rata tertinggi terjadi pada nilai konsentrasi 2,4-D 3 mg/l+BAP 0 mg/l yaitu 56,67% dan terendah pada nilai konsentrasi 2,4-D 0 mg/l +BAP 5 mg/l, 2,4-D 3 mg/l +BAP 5 mg/l serta 2,4-D 5 mg/l +BAP 5 mg/l dengan nilai rata-rata pembentukan kalus sebesar 16,67%.

Nilai persentase pembentukan kalus berfluktuasi naik dan turun seiring meningkatnya nilai konsentrasi 2,4-D dan BAP.

Penambahan auksin dengan konsentrasi rendah akan memacu pembentukan kalus, sebaliknya jika perbandingan auksin dan sitokinin di dalam media lebih tinggi akan memacu kalus beregenerasi membentuk organ. Mulyaningrum *et al.* (2012) menyatakan bahwa interaksi auksin-sitokinin dianggap penting untuk mengatur pertumbuhan dan perkembangan dalam kultur jaringan, karena kedua hormon tersebut umumnya diperlukan oleh tumbuhan. Auksin dan sitokinin eksogen yang ditambahkan akan berinteraksi dengan hormon endogen tanaman. Selain itu, jaringan yang tidak responsif akan menanggapi aplikasi hormone eksogen tersebut. Auksin memiliki pengaruh yang kuat pada proses-proses seperti ekspansi pertumbuhan sel, pengasaman dinding sel, dan mempercepat diferensiasi vaskular. Namun konsentrasi auksin dan sitokinin yang tinggi memiliki tingkat persentase kalus yang rendah karena konsentrasi 2,4-D yang diberikan pada eksplan termasuk tinggi sehingga menghambat pertumbuhan kalus pada eksplan. Auksin lebih bersifat menghambat daripada merangsang pertumbuhan pada kadar yang tinggi (Yunus *et al.*, 2007).

Terhambatnya pertumbuhan kalus tersebut juga disebabkan massa kultur yang ditumbuhkan terlalu lama dalam media yang tetap menyebabkan terjadi berkurangnya unsur hara dan air. Berkurangnya hara dan air dapat terjadi karena selain terserap untuk pertumbuhan kalus, juga disebabkan media menguapkan air dari masa ke masa. Selain berkurangnya unsur hara, kalus juga mengeluarkan persenyawaan-persenyawaan hasil metabolisme yang akhirnya akan menghambat pertumbuhan kalus itu sendiri (Gustian, 2009).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan diagram persentase terbentuknya kalus (sintasan) pada Gambar 4.4



Gambar 4.4 Diagram Persentase Terbentuknya Kalus pada Eksplan Rumput Laut *K. alvarezii* selama 60 Hari Pemeliharaan

Keterangan: A (2,4-D 0 mg/l+BAP 0 mg/l); B (2,4-D 0 mg/l+BAP 3 mg/l); C (2,4-D 0 mg/l+BAP 5 mg/l); D (2,4-D 3 mg/l+BAP 0 mg/l); E (2,4-D 3 mg/l+BAP 3 mg/l); F (2,4-D 3 mg/l+BAP 5 mg/l); G (2,4-D 5 mg/l+BAP 0 mg/l); H (2,4-D 3 mg/l+BAP 5 mg/l) dan I (2,4-D 5 mg/l+BAP 5 mg/l).

Berdasarkan Gambar 4.4 menunjukkan bahwa perlakuan pada kombinasi 2,4-D 3 mg/l+BAP 0 mg/l memiliki persentase kalus hidup tertinggi diduga karena pengaruh auksin secara individual dalam memacu pembentukan kalus dan kebutuhan hormon sitokinin endogen yang sudah mencukupi dalam sel kalus. Selain itu, aktivitas auksin dan sitokinin endogen dalam merangsang pembelahan sel maupun menghambat pertumbuhan tunas. Menurut Fereol *et al.* (2002), penggunaan konsentrasi auksin yang tinggi umumnya menghambat perpanjangan sel dan pertumbuhan tunas serta meningkatkan pelebaran sel sehingga merangsang pertumbuhan kalus.

Berdasarkan penelitian Purmaningsih (2006) menyatakan

bahwa media dasar kultur *in vitro* dengan penambahan 2,4-D 3 mg/l merupakan medium yang paling optimal untuk induksi kalus dan menghasilkan kalus yang remah (*friable*). Perlakuan kombinasi 2,4-D 3 mg/l+BAP 3 mg/l memiliki persentase kalus hidup cukup tinggi karena mengindikasikan konsentrasi yang sesuai dan seimbang antara penambahan auksin (2,4-D) dan sitokinin (BAP) serta pengaruh pemberian hormon eksogen yang diberikan seimbang dengan hormon endogen sehingga mampu secara sinergis merangsang pembentukan kalus (Lee, 2002). Bayu *et al.* (2013) menyatakan konsentrasi sitokinin yang tinggi dapat memacu pertumbuhan tunas, sebaliknya konsentrasi auksin yang tinggi dapat merangsang inisiasi akar. Penambahan zat pengatur tumbuh disesuaikan dengan arah pertumbuhan yang diinginkan. Kombinasi sitokinin dan auksin dengan jumlah dan perbandingan tertentu dapat mempengaruhi pertumbuhan eksplan dalam kultur jaringan (Orcutt and Nilsen, 2000).

Perlakuan pada 2,4-D 0 mg/l+BAP 0 mg/l juga memiliki persentase pembentukan kalus yang cukup tinggi. Hal itu disebabkan karena konsentrasi auksin dan sitokinin endogen yang tinggi pada eksplan telah mampu mendorong pembentukan kalus serta karena kebutuhan hormon pertumbuhan pada rumput laut relatif kecil maka peningkatan konsentrasi auksin (2,4-D) dan sitokinin (BAP) menyebabkan eksplan mengalami pertumbuhan kalus yang rendah (Mulyaningrum *et al.*, 2012). Menurut penelitian Purmaningsih (2006) menyatakan bahwa keberhasilan pembentukan kalus tergantung kepada keseimbangan auksin dan sitokinin didalam media dan interaksi antara zat pengatur tumbuh endogen di dalam tanaman dan zat pengatur tumbuh eksogen yang diserap dari media tumbuh.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-D maupun BAP tidak berpengaruh terhadap persentase eksplan berkalus. Konsentrasi auksin (2,4-D) dan sitokinin (BAP) terbaik dalam pembentukan kalus pada kultur *in vitro* *K. alvarezii* diperoleh pada perlakuan 2,4-D 3 mg/l + BAP 0 mg/l dengan persentase pembentukan kalus sebesar 56,67%. Adapun struktur kalus yang terbentuk ialah berbentuk serabut dan berwarna putih yang diduga merupakan kalus berfilamen (*filamentous callus*) dengan karakteristik filamen tersusun dalam satu baris atau tidak tersusun bercabang-cabang (*uniseriate*) dan berpigmen.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diajukan saran bahwa perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang kombinasi formulasi ZPT optimum dengan beberapa media kultur dan zat pengatur tumbuh yang baik untuk meningkatkan induksi kalus pada rumput laut *K. alvarezii*.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR PUSTAKA

Abidin, Z. 1993. **Dasar-Dasar Tentang Zat Pengatur Tumbuh**. Penerbit Angkasa. Bandung.

Admojo, Lestari dan Indrianto, Ari. 2016. Pencegahan *Browning* Fase Inisiasi Kalus Pada Kultur Midrib Daun Klon Karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) Pb 330. **Indonesian J. Nat. Rubb. Res.** Vol 34 (1): 5-34.

Afrianto, E dan Liviawati. 1993. **Budidaya Rumput Laut dan Cara Pengelolaannya**. Yogyakarta: Bhratara.

Ajijah, N., Tasma, I. dan M., Hadipoentyanti, E. 2010. Induksi Kalus Vanilli (*Vanilla planifolia* ANDREW.) dari Eksplan Daun dan Buku. **Buletin RISTRI**. Vol 1 (5).

Andaryani, S. 2010. Kajian Penggunaan Berbagai Konsentrasi BAP dan 2,4-D Terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) Secara *In Vitro*. **Skripsi**. Fakultas Pertanian. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.

Anggadiredja, T. J., Achmad, Z dan Haripurwanto, S.I. 2007. **Rumput Laut Pembudidayaan, Pengolahan dan Pemasaran Komoditas Perikanan Potensial**. Jakarta: Penebar Swadaya.

Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA). 2006. **The Reconsideration of Approvals of The Active Constituent 2,4-D, Registrations of Products Containing 2,4-D and Their Associated Labels**. Australia: Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority.

Ayuningrum, Kiki., Budisantoso, Iman dan Kamsinah. 2015. Respon Pemberian Hormon 2,4-D dan BAP terhadap Pertumbuhan

Subkultur Kalus Kedelai (*Glycine max* L. Merrill) secara *In Vitro*. **Biosfera**. Vol. 32 (1).

Basyirah, A. 2017. Infeksi Bakteri *Vibrio alginolyticus* Penyebab Penyakit Ice-ice pada Bibit Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* secara Akuakultur. **Skripsi**. Surabaya: Biologi-ITS.

Bayu, Eva S., Harahap, Emi R., dan Siregar. 2013. Pertumbuhan Akar pada Perkecambahan Beberapa Varietas Tomat dengan Pemberian Polyethylene Glikol (PEG) secara *In Vitro*. **Jurnal Online Agroteknologi**. Vol. 1 (3): 418-428.

Bhojwani, S and Razdan., M. K. 1983. **Plant Tissue Culture Theory and Practices**. New York: Elsevier Science Publishing Company Inc.

Blanc, G., Michaux, F. N., Teisson, C., Lardet, L and Carron, M. P. 1999. Effects of Carbohydrate Addition on The Induction of Somatic Embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. Vol 59: 103–112.

BSN. 2011. **Bibit Rumput Laut Kotoni**. < <http://www.bsn.go.id/> > [17 September 2016].

Burla, S., Khan, H., Rahaman., Lavanya, P., and Siri, N. 2014. Effect of Nutrient Media and Phytohormones on *In Vitro* Establishment of *Bambusa balcooa*. Roxb. **International Letters of Natural Sciences**. ISSN: 2300-9675, Vol. 17, pp 1-11.

Chopra, I.; Roberts, M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** Vol 65: 232–260.

Chudobova, D., Dostalova, S., Blazkova, I., Michalek, P., Nedecky, B. R., Sklenar, M., Nejdl, L., Kudr, J., Gumulec, J.,

Tmejova, K., Konecna, M., Vaculovicova, M., Hynek, D., Masarik, M., Kynicky, J., Kizek, R and Adam, V. 2014. Effect of Ampicillin, Streptomycin, Penicillin and Tetracycline on Metal Resistant and Non-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. Vol 11: 3233-3255.

Darmawan, J. dan J.S. Baharsjah. 2010. **Dasar-Dasar Fisiologi Tanaman**. Penerbit SITC.

Da Silva, J. A. 2012. Is BA (6-Benzyladenine) BAP (6-Benzylaminopurine)?. **The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology**. 6 (1): 121-124.

Dawes, C. J. 1981. **Marine Botany**. New York (US): John Willey & Sons.

Destalino. 2013. Cara Mudah Budidaya Rumput Laut Menyehatkan dan Menguntungkan. Kansius Yogyakarta. **Jurnal Penelitian**.

Dewangga, I. G. 2008. Studi Pengaruh Pengeringan Terhadap Kandungan dan Komposisi Pigmen Utama Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* Doty. **Skripsi**. Universitas Diponegoro. Semarang.

Environmental Protection Agency (EPA). 2005. **Reregistration Eligibility Decision for 2,4-D**. List A: Case 0073.

Fadilah, Siti., Alimuddin., Pong-Masak, Petrus Rani., Santoso, Joko and Andi Parenrengi, Andi. 2016. Growth, Morphology and Growth Related Hormone Level in *Kappaphycus alvarezii* Produced by Mass Selection in Gorontalo Waters, Indonesia. **HAYATI Journal of Biosciences**. Vol. 23: 29-34.

Farah, M.A., Ateeq, B., Ali, M.N., Sabir, R and Ahmad, W. 2004. Studies on lethal concentration and toxicity stress of some xenobiotics on aquatic organisms. **Chemosph.** Vol. 55:257-265.

Farid, Akhmad. 2008. Studi lingkungan perairan untuk budidaya rumput laut (*Eucheuma cottonii*) di Perairan Branta, Pamekasan, Madura. **Jurnal Penelitian Perikanan.** Vol. 11 (1): 1-6.

Fatmawati, A. 2008. Kajian Konsentrasi BAP dan 2,4-D terhadap Induksi Kalus Tanaman *Artemisia annua* L. secara *In Vitro*. **Skripsi.** Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.

Fereol, L., Chovelon, V., Causse, S. Michaux-Ferriere, N and Kahane, R. 2002. Evidence of a Somatic Embryogenesis Process for Plant Regeneration in Garlic (*Allium sativum* L). **Plant cell Rep.** Vol. 21:197-203.

Fonnesbech, M. 1992. Growth hormone and propagation of *Cymbidium in vitro*. **Physiol. Plant.** 27: 310-16.

Fowler, M.W. 1983. Commercial application and economic aspects of mass plant cell culture, from Mantell, S.H., Smith, H. (ed.). **Plant Biotechnology.** 3-38. Cambridge University Press, London.

George, E. F. 1993. **Plant Propagation by Tissue Culture.** Part 1. The Technology. Edington: Exegetics Ltd.

Gottardi W. 2001. Chapter 8: Iodine and Iodine Compounds in S. S. Block (eds). **Desinfection, Sterilization, and Preservation 5th edition Lippincott Williams & Wilkins.** ISBN 0-683-30740-1.

Gunawan, L. W. 1987. **Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan.** Bogor: Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi IPB.

Gunawan, I. W. 1988. **Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan**. Laborartorium Kultur Jaringan PAU. Bioteknologi. IPB-Bogor.

Gustian. 2009. Upaya Perbanyak Tanaman Penghasil Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) secara *In Vitro*. **Jurnal Repository Unand**. Vol 562 (1).

Hanning, G. E and Conger, B. V. 1986. Factors influencing somatic embryogenesis from cultured leaf segment of *Dactylisglomerata*. **J. Plant Physiol**. Vol. 1: 23-29.

Harrison and Berges. 2004. **Marine Culture Media**. Dalam R.A Adersen, Editor. Algal Culturing Techniques. UK: Elsevier.

Hartmann, H. T., Kester, D. E and Davies, F. T. 1990. **Plant Propagation: Principles and Practices**. 5th ed. Singapore: Prentice Hall Inc.

Hayashi, L., Yokoya, N. S, Kikuchi, D. M, and Oliveira, E. C. 2008. Callus Induction and Micropropagation Improved by Colchicine and Phyto regulators in *K. alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae). **J Appl Phycol**. 20:653–659.

Hendaryono, D dan Wijayani, A. 1994. **Teknik kultur jaringan, Pengenalan dan Petunjuk Perbanyak Tanaman secara Vegetatif-Modern**. Yogyakarta: Kanisius.

Henuhili, V dan Suratsih. 2012. **Genetika Tanaman**. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta.

Hidayat, A. 1994. **Budidaya Rumput Laut**. Surabaya: Usaha Nasional.

Hitler, S. 2011. **Pengaruh Berat Bibit Awal Yang Berbeda Terhadap Pertumbuhan dan Kadar Keragenan Rumput Laut**

(*Kappaphycus alvarezii*) Varietas Coklat Menggunakan Metode Vertikultur. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Haluoleo. Kendari.

Htwe, Nwe N., Mazlah Mahmood, Ho Chal Ling, Faridah Qamarus Z., and Abdullah M Z. 2011. Responses of some Selected Malaysian Rice Genotypes to Callus Induction under In Vitro Salt Tress. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 10(3), pp. 350-362.

Hutami, S. 2008. Masalah Pencoklatan pada Kultur Jaringan. **Jurnal Agrobien**. Vol 4 (2): 83-88.

Iksan, B. 2005. **Produktivitas Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* yang dibudidayakan oleh Masyarakat Pesisir**. Jurusan Perikanan dan Kelautan Fakultas Pertanian Universitas Nusa Cendana. Kupang.

Indriani, H dan Sumiarsih, E. 2003. **Rumput Laut**. Jakarta: Penebar Swadaya.

Jailani, A. Q., Herawati, E. Y dan Bambang, S. 2015. Studi Kelayakan Lahan Budidaya Rumput Laut *Eucheuma cottonii* di Kecamatan Bluto Sumenep Madura Jawa Timur. **Jurnal Manusia dan Lingkungan**. Vol. 22 (2): 211-216.

Kartika L., Atmojoyo, P.K. dan Purwijantiningsih, L. M. E. 2014. **Kecepatan Induksi Kalus dan Kandungan Eugenol Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz and Pav.) yang Diperlakukan Menggunakan Variasi Jenis dan Konsentrasi Auksin (Makalah)**. Universitas Atma Jaya. Yogyakarta.

Kramer, A., Richter , R., Below, H., Kadow, I., Müller, C and Fusch C. 2006. Effect of Topical 1,25% Povidone-Iodine Eyedrops Used for Prophylaxis of *Ophthalmia neonatorum* on Renal Iodine

Excretion and Thyroid-Stimulating Hormone Level. **The Journal of Pediatrics**. Vol 148 (3): 401-403.

Kumar, G.J., Reddy, C.R.K., Ganesan, M., Thiruppathi, S., Dipakkore, S., Eswaran, K., Rao, P.V.S and Jha, B. 2004. Tissue culture and regeneration of thallus from callus of *Geladiella acerosa* (Geladiales, Rhodophyta). **Phycologia**. Vol. 43: 596-602.

Kumar G.R., Reddy C.R.K. and Jha B. 2007. Callus induction and thallus regeneration from callus of phycocolloid yielding seaweeds from the Indian coast. **J. Appl. Phycol.** Vol. 19: 15 – 25.

Lee K, Jeon H and Kim M. 2002. Optimization of a mature embryo based in vitro culture system for high-frequency somatic embryogenic callus induction and plant regeneration from japonica rice cultivars. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** Vol. 71: 237-244.

Lee, R. E. 2008. **Phycology. Fouth Edition.** Cambridge University Press.

Leifert, C and Cassells, A.C. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. **In vitro Cellular and Development Biology**. Vol. 37:133-138.

Lestari, E. G. 2006. *In Vitro* Selection and Somaclonal Variation for Biotic and Abiotic Stress Tolerance. **Biodiversity**. Vol. 7 (3): 297-301.

Lestari, E.G., Purnamaningsih, R., Mariska, I dan Hutami, S. 2009. Induksi Keragaman Somaklonal dengan Iradiasi Sinar Gamma dan Seleksi *In Vitro* Kalus Pisang Raja Bulu menggunakan Asam Fusarat serta Regenerasi dan Aklimatisasi Planlet. **Berita Biologi**. Vol : 9 (4): 411-417.

Li, C. 2006. Electrochemical Determination of 6-Benzylaminopurine (6-BAP) Using a Single-wall Carbon Nanotube-dicetyl Phosphate Film Coated Glassy Carbon Electrode. **Bull. Korean Chem. Soc.** 27 (7): 991-994.

Minhas, D., Raham, M. V and Grover, A. 1991. Maintenance of Callus Growth During Sub-Culturing is A Genotype Dependent Response In Rice: Mature Seed-Derived Callus from IR 54 Rice Cultivar Lacks Culture Ability. **Curr. Sci Journal.** Vol 77: 1410-1413.

Mellidou, I., Buts, K., Hatoum, D., Ho, Q. T., Johnston, J. W., Watkins, C. B., Schaffer, R. J., Gapper, N. E., Giovannoni, J. J., Rudell, D. R., Hertog, M. L. A. T. M., and Nicolai, B. M. 2014. Transcriptomic events associated with internal browning of apple during postharvest storage. **BMC Plant Biology.** Vol. 14: 328.

Molina, D., Aponte, M. E., Cortina, H and Moreno, G. 2002. The Effect of Genotype and Explant Age on Somatic Embryogenesis of Coffee. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** Vol. 71 (2): 117-123.

Mulyaningrum, SRH., Nursyam, H., Risjani, Y and Parenrengi, A. 2012. Regeneration filament of *Kappaphycus alvarezii* callus by different plant growth regulator. **J Pen Perik.** Vol. 1: 52-60.

Munõz J., Lõpez A.C.C., Patiño R. and Robledo D. 2006. Use of plant plant growth regulators in micropropagation of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) in airlift bioreactors. *J. Appl. Phycol.* Vol. 18: 209-218.

Nursyamsi dan Suhartati. 2007. Pengaruh Hormon BAP terhadap Perbanyakan Tanaman Gaharu (*Gyrinops verstegii* Domke) Secara

Kultur Jaringan. **Jurnal Penelitian Hutan Tanaman**. Vol. 4 (1). Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan Tanaman. Bogor.

Ongaro, V and Leyser, O. 2008. Hormonal control of shoot branching. **J Exp Bot**. Vol. 59: 67-74.

Orcutt, D. M and Nilsen, E. T. 2000. **Physiology of Plants Under Stress Soil and Biotic Factors**. John Willey and Sons, Inc. Canada.

Panrenrengi, A., Rachmansyah, S. E. 2011. **Budidaya Rumput Laut Penghasil Karaginan (Karaginofit)**. Edisi Revisi. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kelautan dan Perikanan. Kementerian Kelautan dan Perikanan.

Purmaningsih, Ragapadmi. 2006. Induksi Kalus dan Optimasi Regenerasi Empat Varietas Padi melalui Kultur *In Vitro*. *Jurnal AgroBiogen*. Vol. 2 (2):74-80.

Qurratu, A and Reehan, A. 2016. A Review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Derivatives: 2,4-D Dimethylamine Salt and 2,4-D Butyl Ester. **International Journal of Applied Engineering**. 11 (19): 9946-9955.

Rahayu, B., Solichatun., dan Endang, A. 2003. Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L. **Biofarmasi**. Vol 1 (1): 1-6.

Reddy, C. R. K., Kumar, G. R. K, Shiddhanta, A. K and Tewari, A. 2003. *In Vitro* Somatic Embryogenesis and Regeneration of Somatic Embryos from Pigmented Callus of *K. alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta, Gigartinales). **J. Phycol**. Vol. 39:610–616.

Rorrer G.L. and Cheney D.P. 2004. Bioprocess engineering of cell and tissue cultures for marine seaweeds. **Aquacultural Engineering**. Vol 32: 11–41.

Ru, Z., Lai, Y., Xu, C., and Li, L. (2013). Polyphenol oxidase (PPO) in early stage of browning of *Phalaenopsis* leaf explants. **Journal of Agricultural Science**. Vol. 5 (9): 57-64.

Sitorus, E. N., E. D. Hastuti., dan N. Setiari. 2011. Induksi Kalus Binahong (*Basella rubra* L.) secara *In Vitro* pada Media Murashige & Skoog dengan Konsentrasi Sukrosa yang Berbeda. **Bioma**. Vol. 13 (1): 1410-8801.

Sudrajad, Heru., Suharto, Didik., dan Wijaya, Nur Rahmawati. 2016. Inisiasi Kalus Sanrego (*Lunasia amara* Blanco.) dalam Kultur Jaringan. **Proceeding Biology Education Conference**. Vol 13 (1): 619-623.

Sugiyarto, Lili dan Paramita, Cahyaningrum Kuswandi. 2014. Pengaruh 2,4 Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan Benzyl Aminopurin (BAP) Terhadap Pertumbuhan Kalus Daun Binahong (*Anredera cordifolia* L.) serta Analisis Kandungan Flavonoid Total. **Jurnal Penelitian Saintek**. Vol. 19 (1).

Sugiyono, A. 2002. Pemasaran Pertanian. Malang : UMM Press.

Sulistijo, W. S. 2002. **Budidaya Rumput Laut dan Upaya Pengembangannya**. Makalah pada KIPNAS IV. Jakarta.

Sulistiani, E., Soelistyowati, D. T dan Yani, S. A. 2010. Acclimatitation and Field Cultivation of Regenerated Cottoni Seaweed (*K. alvarezii*). **Research Report**. Bogor: SEAMEO BIOTROP.

Sulistiani, E., Soelistyowati, DT., Alimuddin and Yani, S.A. 2012. Callus induction and filaments regeneration from callus of cottonii seaweed (*Kappaphycus alvarezii* (Doty)) collected from Natuna Islands, Riau Islands Province. **Biotropia**. Vol. 19: 103-14.

Sulistiani, E., Soelistyowati dan Yani, S.A. 2014. Tissue Culture on Seaweed (*K. alvarezii*). **Seameo Biotrop**. p.128.

Suryati, E dan Mulyaningrum, S. R. H. 2007. Regenerasi Rumput Laut *K. alvarezii* (Doty) Melalui Induksi Kalus dan Embrio dengan Penambahan Hormon Perangsang Tumbuh Secara *In Vitro*. **J. Ris. Akuakultur**. Vol 1: 39-45.

Sutrian, Y. 2004. **Pengantar Anatomi Tumbuhan-Tumbuhan Tentang Jaringan Sel dan Jaringan**. Jakarta: PT Rineka Cipta.

Thomas, T. D and Chaturvedi, R. 2008. Endosperm Culture: A Novel Method for Triploid Plant Production. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 93: 1-14.

Tuiyo, R. 2016. **Budidaya Alga Laut (*Kappaphycus alvarezii*) dalam Kantong Plastik dengan Menggunakan Teknologi Basningro**. Gorontalo: UNG Press.

Turhan, H. 2004. Callus Induction and Growth in Transgenic Potato Genotype. **African Journal of Biotechnology**. Vol 3 (8): 375-378.

Unyayar, S., Topcuoglu, SF and Unyayar, A. 1996. A modified method for extraction and modification of indole-3-acetic acid (IAA), gibberellic acid (GA3), abscisic acid (ABA) and zeatin produced by *Phanerochate chrysosporium* ME446. **Bulg J Plant Physiol**. Vol. 22: 10-105.

Vicente, A and Yolanda, P. 2004. Determination of Pesticides and Their Degradation Products in Soil: Critical Review and Comparison of Methods. **Trends in Analytical Chemistry**. Vol. 23 (10-11):772-789.

Widiarso, M. 2010. Kajian Penggunaan BAP dan IBA untuk Merangsang Pembentukan Tunas Lengkeng (*Dimocarpus longan* Lour) Varietas Pingpong Secara *In Vitro*. **Skripsi**. Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.

Widyaiswara, L. 2005. **Teknologi Aplikasi Zat Pengatur Tumbuh**. BPP Jambi

Winarno, F, G. 1996. **Teknologi Pengolahan Rumput Laut**. Jakarta: Pustaka Sinar Harapan.

Winarsih S., Santoso, D and Wardiyati, T. 2002. Embriogenesis Somatik dan Regenerasi dari Eksplan Embrio Zigotik Kakao (*Theobroma cacao* L.). **Pelita Perkebunan**. Vol. 18(3): 99-108.

Wattimena, G. A. 1992. **Bioteknologi Tanaman**. Pusat Antar Universitas (PAU) Bioteknologi IPB. Bogor.

Wattimena, G. A. 2001. **Zat Pengatur Tumbuh Tanaman**. IPB, Bogor

Widiastoety, D. 2014. Pengaruh Auksin dan Sitokinin Terhadap Pertumbuhan Planlet Angrek Mokara. **J. Hort**. 24 (3): 230-238.

Wiendi, N. M. A., Wattimena, G. A., Maatjik, N. A., Sjamsudin., L. W., Gunawan., A dan Ernawati. 1991. Perbanyakan Tanaman. **Bioteknologi Tanaman**. Hal 561-566. PAU-IPB. Bogor.

Wulandari, Andini Nur. 2016. Analisis Pemasaran dan Strategi Pengembangan Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*) di Desa Tanjung

Kecamatan Saronggi Kabupaten Sumenep. **Skripsi**. Fakultas Pertanian. Universitas Jember.

Yokoya N.S and Handro W. 1996. Effect of auxins and cytokinins on tissue culture of *Grateloupia dichotoma* (Gigartinales, Rhodophyta). **Hydrobiologia**. Vol. 326: 393 –400.

Yokoya, N.S., West, J.A and Luchi, A.E. 2004. Effects of plant growth regulators on callus formation, growth and regeneration in axenic tissue cultures of *Gracilaria tenuistipitata* and *Gracilaria perplexa* (Gracilariales, Rhodophyta). **Phycol Res**. Vol. 52: 244-252.

Yokoya, NS. 2010. Endogenous cytokinins, auxins and abscisic acid in red algae from Brazil. **J Phycol**. Vol. 46: 1198-1205.

Yong, W. T. L., Ting, S. H., Chin, W. L., Rodrigues, K. F and Anton, A. 2011. In Vitro Micropropagation of *Eucheuma* Seaweeds. **2nd International Conference on Biotechnology and Food Science**. IPCBEE. Vol. 7: 58-60.

Yunus, A., Samanhudi, dan Nofiyanti, D. 2007. Pengaruh Konsentrasi IBA dan BA terhadap Pertumbuhan Eksplan Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) secara In Vitro. **Jurnal Agrosains**. Vol. 9(2): 41-52.

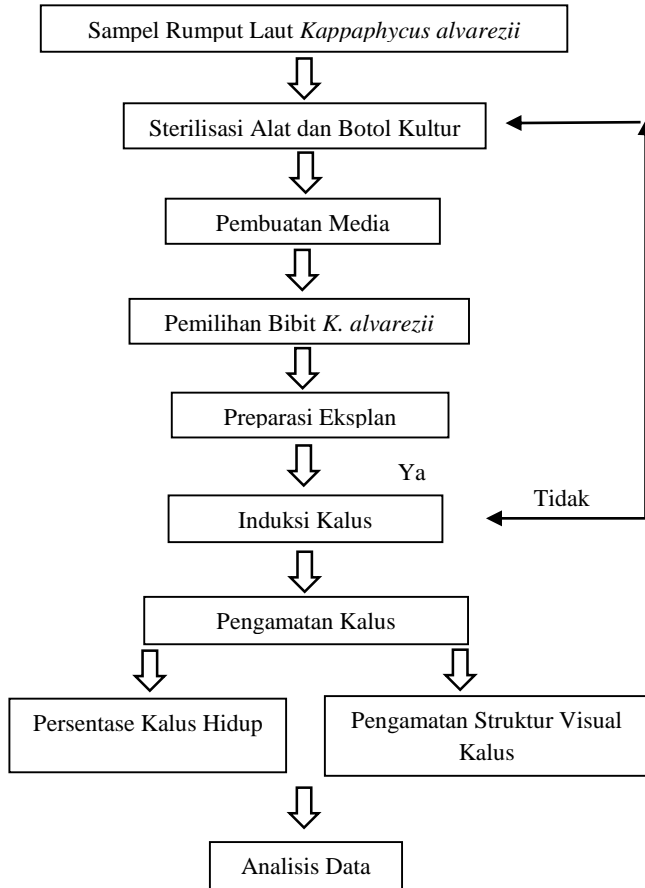
Yusnita. 2004. **Kultur Jaringan Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien**. Jakarta: Agromedia Pustaka.

Zitta, Carmen S., Rover, Ticiane., Hayashi, Leila., and Bouzon, Zenilda L. 2013. Callus ontogeny of the *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) brown tetrasporophyte strain. **J Appl Phycol**. Vol. 25: 615–629.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

LAMPIRAN

Lampiran 1: Diagram Alur Penelitian



Lampiran 2: Komposisi Medium PES (dalam 500 ml)

Komponen Kimia	Stock Solution	Jumlah
TRIS Base		5 g
NaNO ₃		3,5 g
Na ₂ b-glycerophospate		0,5 g
Iron-EDTA Solution		250 ml
P II trace metal solution		25 ml
Thiamine (Vit. B1)		0,5 mg
Biotin	5 mg/l dH ₂ O	1 ml
Cyanocobalomin (Vit. B12)	10 mg/l dH ₂ O	1 ml

Sumber: Provasoli (1968)

Lampiran 3: Perhitungan Persentase Terbentuknya Kalus Rumput Laut *K. alvarezii*

1. Persentase Terbentuknya Kalus (Sintasan)

Persentase Terbentuknya Kalus (%)

$$= \frac{\text{jumlah eksplan membentuk kalus}}{\text{jumlah eksplan ditanam}} \times 100\%$$

$$= \frac{6}{10} \times 100\%$$

$$= 60\%$$

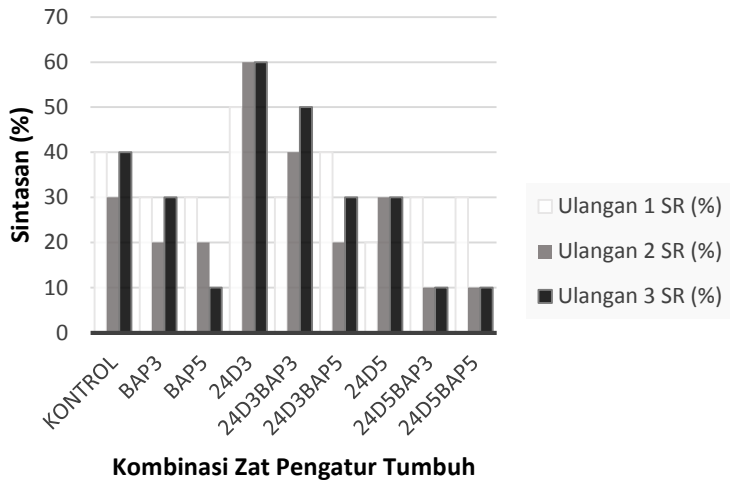
Keterangan dan penjelasan:

- Angka “6” merupakan jumlah eksplan membentuk kalus (N_0) dalam botol kultur (cawan petri) dalam pengamatan kalus rumput laut *K. alvarezii*
- Angka “10” merupakan jumlah eksplan ditanam (N_0) dalam botol kultur (cawan petri) dalam pengamatan kalus rumput laut *K. alvarezii*
- Persentase dinyatakan dalam satuan persen yang biasa ditulis dengan lambang satuan “%”.

Lampiran 4: Tabel Perhitungan Pengaruh Kombinasi 2,4-D dan BAP pada Persentase Terbentuknya Kalus Rumput Laut *K. alvarezii*

No	Perlakuan	Ulangan 1			Ulangan 2			Ulangan 3			Rata-rata (%)
		N _o	N _t	SR (%)	N _o	N _t	SR (%)	N _o	N _t	SR (%)	
1	Kontrol	10	4	40	10	3	30	10	4	40	36,67
2	BAP 3 mg/l	10	3	30	10	2	20	10	3	30	26,67
3	BAP 5 mg/l	10	3	30	10	2	20	10	1	10	20
4	2,4-D 3 mg/l	10	5	50	10	6	60	10	6	60	56,67
5	2,4-D 3 mg/l+BA P 3 mg/l	10	3	30	10	4	40	10	5	50	40
6	2,4-D 3 mg/l+BA P 5 mg/l	10	4	40	10	2	20	10	3	30	30
7	2,4-D 5 mg/l	10	2	20	10	3	30	10	3	30	26,67
8	2,4-D 5 mg/l+BA P 3 mg/l	10	3	30	10	1	10	10	1	10	16,67
9	2,4-D 5 mg/l+BA P 5 mg/l	10	3	30	10	1	10	10	1	10	16,67

Lampiran 5: Persentase Terbentuknya Kalus dengan Kombinasi 2,4-D dan BAP pada Kalus Rumput Laut *K. alvarezii* dari 3 Ulangan



Lampiran 6: Data Analisis Uji ANOVA Two Way dengan Menggunakan Aplikasi IBM SPSS Statistics Data Editor

Descriptive Statistics

Dependent Variable: SR

Auksin	Sitokinin	Mean	Std. Deviation	N
0	0	36,67	5,774	3
	3	26,67	5,774	3
	5	20,00	10,000	3
	Total	27,78	9,718	9
3	0	56,67	5,774	3
	3	40,00	10,000	3
	5	30,00	10,000	3
	Total	42,22	13,944	9
5	0	26,67	5,774	3
	3	16,67	11,547	3
	5	16,67	11,547	3
	Total	20,00	10,000	9
Total	0	40,00	14,142	9
	3	27,78	13,017	9
	5	22,22	10,929	9
	Total	30,00	14,412	27

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: SR

F	df1	df2	Sig.
,641	8	18	,734

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Auksin + Sitokinin + Auksin * Sitokinin

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: SR

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4000,000 ^a	8	500,000	6,429	,001
Intercept	24300,000	1	24300,00	312,429	,000
Auksin	2288,889	2	1144,444	14,714	,000
Sitokinin	1488,889	2	744,444	9,571	,001
Auksin * Sitokinin	222,222	4	55,556	,714	,593
Error	1400,000	18	77,778		
Total	29700,000	27			
Corrected Total	5400,000	26			

a. R Squared = ,741 (Adjusted R Squared = ,626)

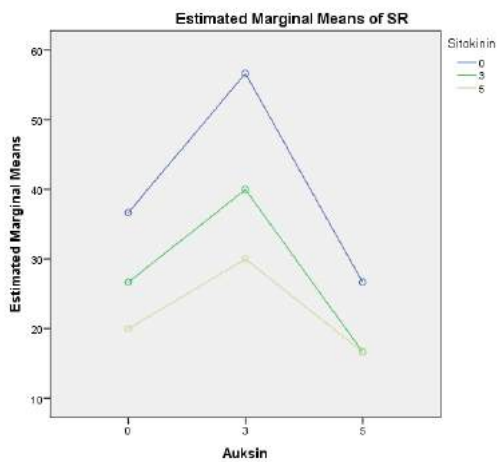
Homogeneous Subsets**SR**Tukey HSD^{a,b}

Auksin	N	Subset	
		1	2
5	9	20,00	42,22
0	9	27,78	
3	9		
Sig.		,176	1,000



SRTukey HSD^{a,b}


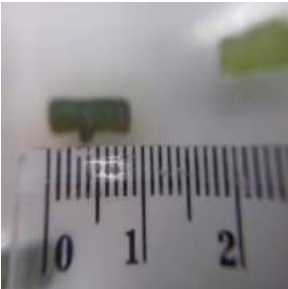

Sitokinin	N	Subset	
		1	2
5	9	22,22	40,00
3	9	27,78	
0	9		
Sig.		,394	1,000


Profile Plots



Lampiran 7: Langkah Kerja Penelitian Induksi Kalus Rumput Laut *K. alvarezii*

No	Gambar Kegiatan	Keterangan
1		Alat dan bahan dilakukan sterilisasi pada autoklaf
2		Alat dan bahan disiapkan untuk pembuatan media kultur di ruang preparasi media padat
3		Rumput laut yang sudah diaklimatisasi selama 2 bulan (60 hari) dipilih untuk dijadikan sebagai calon eksplan

4		Bagian talus primer (talus cabang 1) pada rumput laut dipotong sebagai sumber eksplan
5		Ukuran talus rumput laut dipotong sebesar ± 1 cm
6		Media kulltur PES dibuat di ruangan <i>Laminar Air Flow</i> (LAF)

7	 A petri dish containing a white agar medium. Numerous small, rectangular, green explants of sea grass are arranged in a grid-like pattern on the surface of the medium. A small white label with the number '5' is visible in the upper left corner of the dish.	<p>Eksplan rumput laut diletakkan pada media skrining selama 7 hari (1 minggu)</p>
8	 A petri dish containing a white agar medium. Several small, rectangular, green explants of sea grass are arranged in a grid-like pattern on the surface of the medium. A small white label with the number '16' is visible in the upper left corner of the dish.	<p>Eksplan rumput laut dipindahkan ke media perlakuan kombinasi ZPT dari media skrining. Pengamatan kalus selama 2 bulan (60 hari).</p>

Lampiran 8: Dokumentasi Respon Induksi Kalus pada Eksplan Rumpun Laut *K. alvarezii*



Gambar 1. Perlakuan Kombinasi 2,4-D 0 mg/l+BAP 0 mg/l (Kontrol)



Gambar 2. Perlakuan Kombinasi 2,4-D 0 mg/l+BAP 3 mg/l



Gambar 3. Perlakuan Kombinasi 2,4-D 0 mg/l+BAP 5 mg/l



Gambar 4. Perlakuan Kombinasi 2,4-D 3 mg/l+BAP 0 mg/l



Gambar 5. Perlakuan Kombinasi 2,4-D 3 mg/l+BAP 3 mg/l



Gambar 6. Perlakuan Kombinasi 2,4-D 3 mg/l+BAP 5 mg/l



Gambar 7. Perlakuan Kombinasi 2,4-D 5 mg/l+BAP 0 mg/l

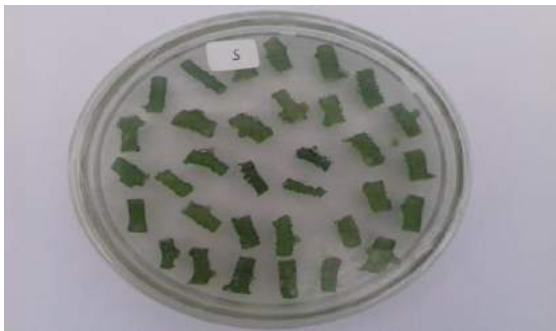
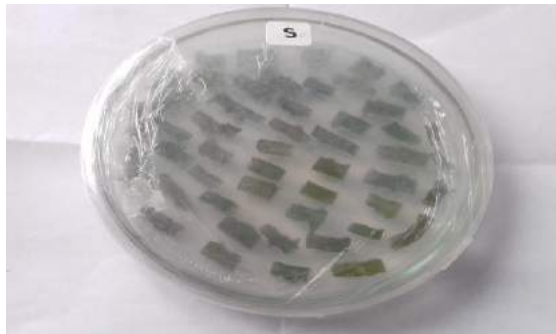
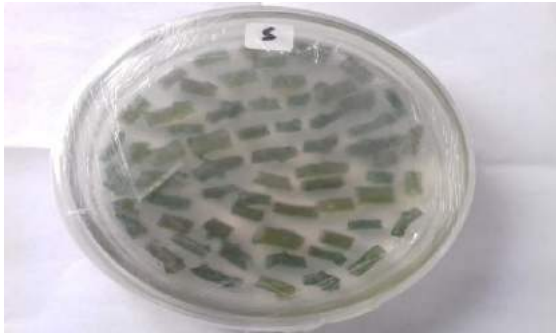


Gambar 8. Perlakuan Kombinasi 2,4-D 5 mg/l+BAP 3 mg/l

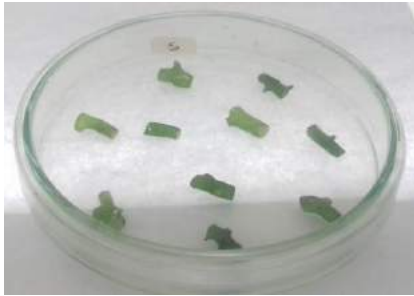


Gambar 9. Perlakuan Kombinasi 2,4-D 5 mg/l+BAP 5 mg/l

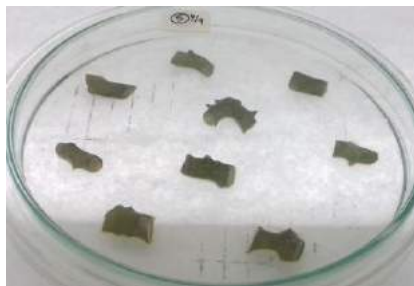
Lampiran 9: Dokumentasi Eksplan pada Media Skrining



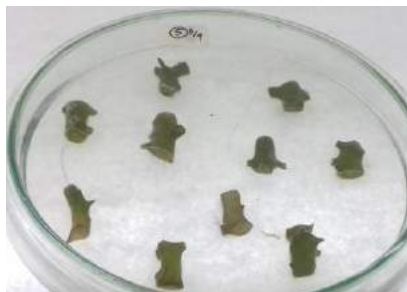
Lampiran 10: Dokumentasi Eksplan pada Media Kombinasi ZPT 2,4-D dan BAP



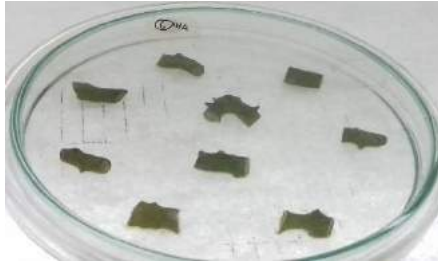
Gambar 1. Perlakuan Kombinasi 2,4-D 0 mg/l+BAP 0 mg/l (Kontrol)



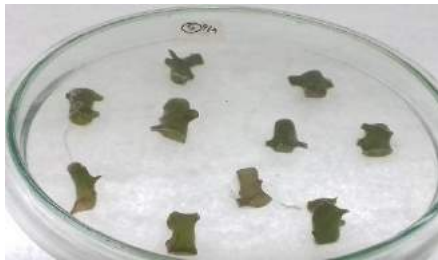
Gambar 2. Perlakuan Kombinasi 2,4-D 0 mg/l+BAP 3 mg/l



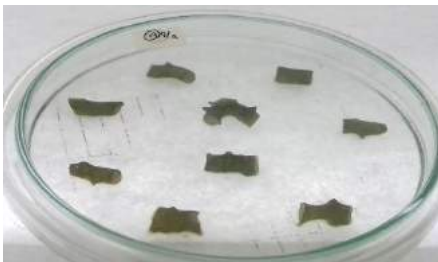
Gambar 3. Perlakuan Kombinasi 2,4-D 0 mg/l+BAP 5 mg/l



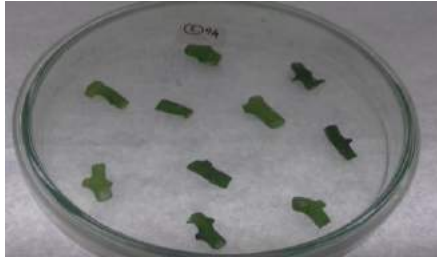
Gambar 4. Perlakuan Kombinasi 2,4-D 3 mg/l+BAP 0 mg/l



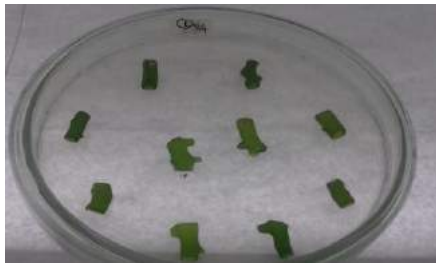
Gambar 5. Perlakuan Kombinasi 2,4-D 3 mg/l+BAP 3 mg/l



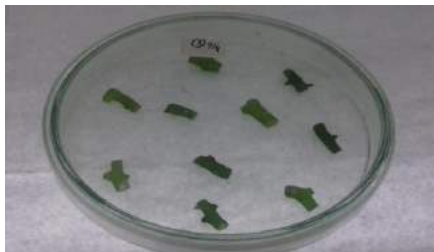
Gambar 6. Perlakuan Kombinasi 2,4-D 3 mg/l+BAP 5 mg/l



Gambar 7. Perlakuan Kombinasi 2,4-D 5 mg/l+BAP 0 mg/l



Gambar 8. Perlakuan Kombinasi 2,4-D 5 mg/l+BAP 3 mg/l



Gambar 9. Perlakuan Kombinasi 2,4-D 5 mg/l+BAP 5 mg/l

BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Sumenep, 7 Februari 1996. Penulis merupakan anak kedua dari empat bersaudara dari pasangan Akhmad Gazali dan Fatin Huzaini. Penulis memulai pendidikan di SDN Batuan I, Sumenep, SMPN I Sumenep, dan SMAN I Sumenep. Setelah lulus pendidikan SMA, penulis melanjutkan pendidikan S1 Departemen Biologi Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya. Penulis aktif mengikuti organisasi mahasiswa seperti

Himpunan Mahasiswa Biologi ITS (HIMABITS) sebagai Staf departemen dalam negeri periode 2015/2016, ketua divisi internalisasi dan kajian strategis departemen dalam negeri periode 2016/2017, lembaga dakwah jurusan FKIQ Biologi ITS sebagai Ketua departemen kaderisasi periode 2016/2017 serta Ketua departemen internal Paguyuban KSE (Karya Salemba Empat) ITS periode 2017/2018. Prestasi yang telah dicapai oleh penulis antara lain anggota tim Poteran batch 3 *Sustainable Island Development Initiative* (SR&DT) tahun 2016, Semifinalis LKTI *Scientific Great Moment* (SGM) 7 *Agritech Research and Study Club* (ARSC) Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya 2017 serta Finalis LKTI *Winslow Scientific Paper Competition* (WSPC) Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Hasanuddin, Makassar tahun 2018. Penulis saat ini tertarik dalam minat bidang biosains dan teknologi tumbuhan khususnya tentang kultur jaringan dan bergabung dalam grup riset penelitian dibawah bimbingan bapak Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, S.Si, M.Si yaitu *biomaterial and enzyme technology research group*.